



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ AUTOTROFNÍCH ŘAS K PRODUKCI
VYBRANÝCH METABOLITŮ A BIOMASY**

USE OF AUTOTROPHIC ALGAE TO PRODUCTION OF BIOMASS AND SOME METABOLITES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nikola Chrástová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1095/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Nikola Chrástová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Využití autotrofních řas k produkci vybraných metabolitů a biomasy

Zadání bakalářské práce zadání:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Screening a kultivace vybraných druhů řas
2. Izolace, charakterizace a kvantifikace řasové biomasy a extrakce vybraných metabolitů
3. Biologické účinky řas a jejich složek

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Nikola Chrástová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Chlorofyly a karotenoidy jsou přírodní pigmenty sloužící jako antioxidanty. Tyto látky jsou vhodné k použití ve farmacii, kosmetice nebo potravinářství. Lipidy jsou dalším významným metabolitem řas a jsou potenciální surovinou k produkci biopaliv. Tato bakalářská práce se zabývá kultivací zvolených druhů autotrofních řas, následnou izolací těchto vybraných metabolitů a jejich využitím. Teoretická část je zaměřena na popis řas, na produkované metabolity, kultivaci a zvolené metody. Experimentální část se zabývá optimalizací kultivace řas rodu *Chlorella*, *Chlamydomonas* a *Desmodesmus* v závislosti na zvoleném médiu a intenzitě osvětlení, stanovením a kvantifikací řasové biomasy. Dále pak extrakcí lipidických a karotenoidních látek a jejich stanovení pomocí HPLC a GC. V celkovém srovnání je nejlepším producentem biomasy rod *Desmodesmus* a nejvyšší produkce pigmentů a lipidických látek dosahoval rod *Chlamydomonas*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Řasy, biomasa, lipidické látky, karotenoidy, chlorofyl, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Desmodesmus*

ABSTRACT

Chlorophyll and carotenoids are natural pigments and antioxidants. These pigments are suitable for use in the pharmaceutical, cosmetics or food industries. Lipids are another major metabolite of algae and are a potential feedstock for biofuel production. This bachelor thesis deals with the cultivation of selected genera of autotrophic algae, subsequent isolation of these selected metabolites and their application. The theoretical part focuses on the description of the algae, the metabolites produced, the cultivation and the chosen methods. The experimental part deals with the optimization of the cultivation of algae of the genera *Chlorella*, *Chlamydomonas* and *Desmodesmus*, depending on the chosen medium and intensity of illumination, determination and quantification of algal biomass. Further, extraction of lipidic and carotenoid substances and determination by HPLC and GC was performed. In the overall comparison, the best producer of biomass is the algal genus *Desmodesmus* and the highest production of pigments and lipid substances was reached in algae of the genus *Chlamydomonas*.

KEYWORDS

Algae, biomass, lipid substances, carotenoids, chlorophyll, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Desmodesmus*

CHRÁSTOVÁ, N. Využití autotrofních řas k produkci vybraných metabolitů a biomasy. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

V této části chci poděkovat své vedoucí práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady a připomínky, vedení a čas, který mi věnovala při tvorbě bakalářské práce. Další velké poděkování náleží mým konzultantům Ing. Martinu Szotkowskému a Ing. Daně Byrtusové za cenné rady, pomoc a nesmírnou ochotu při zpracování experimentální části. V neposlední řadě cenné díky patří rodině a přátelům, kteří mne celou dobu studia podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Řasy	10
2.1.1	Rod <i>Chlorella</i>	10
2.1.2	Rod <i>Chlamydomonas</i>	11
2.1.3	Rod <i>Desmodesmus</i>	11
2.1.4	Biologické účinky řas a jejich složek	12
2.2	Vybrané metabolity řas	12
2.2.1	Biomasa	12
2.2.1.1	Methylestery a ethylestery mastných kyselin.....	13
2.2.2	Lipidické látky	13
2.2.2.1	Triacylglyceroly	13
2.2.2.2	Biosyntéza triacylglycerolů.....	14
2.2.2.3	Mastné kyseliny	14
2.2.2.4	Biosyntéza mastných kyselin	15
2.2.3	Steroly.....	17
2.2.4	Pigmenty a antioxidanty	17
2.2.4.1	Chlorofyl	17
2.2.4.2	Biosyntéza chlorofylu	18
2.2.4.3	Karotenoidy	19
2.2.4.4	Biosyntéza karotenoidů.....	19
2.3	Kultivace řas	20
2.3.1	Kultivační metody	21
2.3.1.1	Druhy kultivace	21
2.3.2	Vliv kultivačních podmínek	21
2.3.2.1	Médium	21
2.3.2.2	Teplota.....	21
2.3.2.3	Světlo.....	21
2.3.2.4	Hodnota pH	22
2.3.2.5	Salinita.....	22
2.3.2.6	Kultivační nádoby	22
2.4	Metody analýzy biomasy a metabolitů	22
2.4.1	Extrakce	22
2.4.2	Transesterifikace.....	22
2.4.3	Absorpční spektrofotometrie	22
2.4.4	Chromatografie	22

2.4.4.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	23
2.4.4.2	Plynová chromatografie	23
3	CÍL PRÁCE.....	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Použité chemikálie	25
4.1.1	Chemikálie použité pro kultivaci řas a sinic	25
4.1.2	Chemikálie použité pro extrakce	25
4.1.3	Chemikálie použité pro HPLC a GC	25
4.2	Použité přístroje a pomůcky	26
4.2.1	Přístroje a pomůcky pro kultivaci.....	26
4.2.2	Přístroje a pomůcky pro izolaci a analýzu látek	26
4.3	Požité kmeny řas	26
4.4	Kultivace řas	26
4.4.1	Autotrofní kultivace v multikultivátoru.....	27
4.4.2	Heterotrofní a mixotrofní kultivace	28
4.4.3	Velkoobjemová kultivace	29
4.5	Izolace, stanovení, analýza řasové biomasy a vybraných metabolitů	29
4.5.1	Gravimetrické stanovení biomasy	29
4.5.2	Izolace dle Folche	29
4.5.3	Analýza karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	29
4.5.4	Transesterifikace lipidů	29
4.5.5	Analýza lipidů	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	31
5.1	Výsledky kultivací řasy <i>Chlorella vulgaris</i>	31
5.1.1	Autotrofní kultivace	31
5.1.1.1	Růstové křivky	31
5.1.1.2	Stanovení celkové biomasy	32
5.1.1.3	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	33
5.1.1.4	Produkce lipidů	34
5.1.2	Heterotrofní kultivace	36
5.1.2.1	Celková biomasa	37
5.1.2.2	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	38
5.1.3	Mixotrofní kultivace	38
5.1.3.1	Celková biomasa	39
5.1.3.2	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	40
5.1.4	Zhodnocení kultivací <i>Chlorella vulgaris</i>	40
5.2	Výsledky kultivací řasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	40

5.2.1	Autotrofní kultivace	40
5.2.1.1	Růstové křivky	41
5.2.1.2	Celková biomasa	42
5.2.1.3	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	42
5.2.1.4	Produkce lipidů	43
5.2.2	Heterotrofní kultivace	46
5.2.2.1	Celková biomasa	46
5.2.2.2	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	47
5.2.3	Mixotrofní kultivace	48
5.2.3.1	Celková biomasa	48
5.2.3.2	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	48
5.2.4	Celkové zhodnocení kultivací <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	49
5.3	Výsledky kultivací řasy <i>Desmodesmus acutus</i>	49
5.3.1	Autotrofní kultivace	49
5.3.1.1	Růstové křivky	49
5.3.1.2	Celková biomasa	50
5.3.1.3	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	51
5.3.1.4	Produkce lipidů	52
5.3.2	Heterotrofní kultivace	55
5.3.2.1	Celková biomasa	55
5.3.2.2	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	56
5.3.3	Mixotrofní kultivace	57
5.3.3.1	Celková biomasa	57
5.3.3.2	Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu	58
5.3.4	Zhodnocení kultivací <i>Desmodesmus acustus</i>	58
5.4	Velkoobjemová kultivace	58
6	ZÁVĚR.....	60
7	POUŽITÁ LITERATURA	61
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	63

1 ÚVOD

Rozmach techniky a průmyslu s sebou nese mnohé výhody, ale také negativní následky ve formě úbytku zásob nerostných surovin. Současný cíl biotechnologií je nalézt vhodné suroviny a pomocí mikroorganismů je přeměnit na zpracovatelnou biomasu, kterou dále lze využít k mnohým účelům, např. jako biopaliva, nutriční a výživové doplňky nebo přísady do léčiv a kosmetiky.

V posledních letech se do popředí zájmu dostaly mikrořasy, a to díky jejich zajímavému chemickému složení a nízkým nákladům na produkci. Jejich hlavní potenciál je spatřován ve vysokém obsahu lipidických látek, především polynenasycených mastných kyselin a přírodních barviv jako jsou karotenoidy a chlorofyly, a rovněž proteinů a sacharidů. Lipidické látky plní v organismech několik důležitých funkcí, jsou stavební jednotkou, zdrojem a zásobárnou energie. Ty produkované mikrořasami jsou vhodné zejména k výrobě biopaliv třetí generace. Přírodní barviva mají také mnoho funkcí, důležité jsou jako prekurzory vitamínů, antioxidanty nebo nezbytný prvek ve fotosyntetickém aparátu. Využití nachází v potravinářském, farmaceutickém nebo kosmetickém průmyslu. Lze z nich vyrábět léčiva, vitamínové preparáty, potravinářská barviva nebo doplňky stavy.

Obsahem této práce je optimalizace kultivačních podmínek vybraných kmenů řas z hlediska tvorby biomasy, produkce lipidických látek a pigmentů. Řasy byly kultivovány ve dvou typech základních médií, jak autotrofně, tak i heterotrofně a mixotrofně s přidavkem dvou různých organických zdrojů uhlíku. U každého kmene řas byl určen nejvhodnější kultivační způsob a podmínky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Řasy

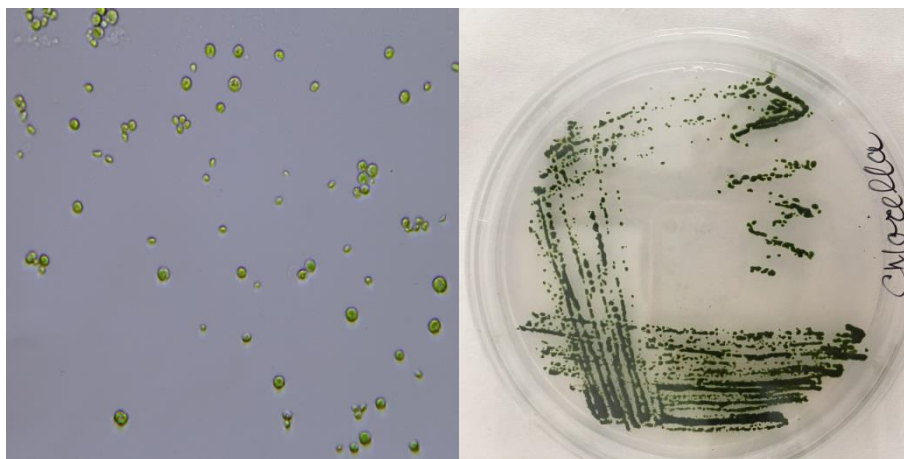
Řasami se obecně označují vývojově staré eukaryotické systémy, které jsou schopné fotosyntézy. Řadí se k nejstarším organismům na Zemi, jejich stáří je odhadováno zhruba na 1,7 miliardy let. Mikrořasy jsou ale od řas evolučně vzdálené mikroorganismy. Vyskytují se převážně v jednobuněčné formě nebo mohou tvořit mnohobuněčné stélky. Jejich fotosyntetický proces je podobný vyšším rostlinám. Mají také výhodu velmi rychlých reprodukčních cyklů, vyšší odolnost vůči intenzivnímu záření a lepší účinnost přeměny energie na biomasu.

Tyto mikroskopické fotosyntetizující organismy žijí jak ve sladkých, tak ve slaných vodách. Vykytují se téměř po celém světě, od rovníku až po polární pásma. V některých oblastech jsou to jediné žijící organismy, je to způsobeno tím, že mikrořasy jsou fyzicky velmi odolné vůči teplotním výkyvům a změnám. V současné době je známo okolo 400 000 zástupců mikrořas, avšak pouze asi 20 zástupců je používáno komerčně [1, 2, 3, 4].

2.1.1 Rod *Chlorella*

Chlorella je rod jednobuněčných řas, které žijí ve sladkých vodách a rozmnožují se výhradně dělením. Buňky tohoto rodu neobsahují žádné pohybové orgány (bičinky). Jejich tvar je kulovitý a velikost se pohybuje kolem 2 až 10 μm . Oproti ostatním rostlinám a řasám obsahují velké množství chlorofylu. Více než polovinu jejich biomasy tvoří proteiny. Dále pak obsahují sacharidy, vitamíny a minerály. V malém množství se v nich nachází i karotenoidy a lipidy, které jsou tvořeny z velké části kyselinou palmitovou a linoleovou.

Díky tomu, že buňka obsahuje velké množství vitamínu B a C, je rod *Chlorella* využíván především jako výživový doplněk, na jehož produkci se zaměřilo nemálo farmaceutických a biotechnologických firem. Napomáhá k udržení přirozené obranyschopnosti, k normální funkci jater, srdce a střevního traktu, slouží jako antioxidant. Mezi nejznámější a nejpoužívanější zástupce patří *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* a *Chlorella lobophora* [2, 5].

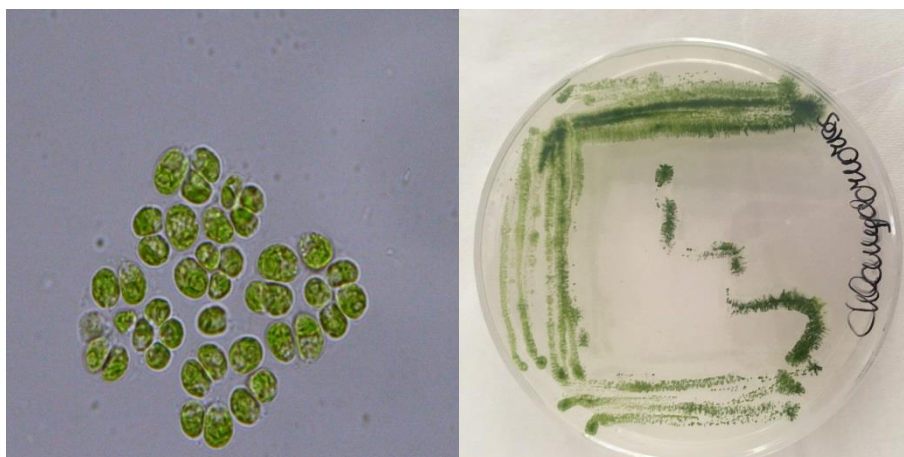


Obrázek 1 *Chlorella vulgaris*

2.1.2 Rod *Chlamydomonas*

Tento rod jednobuněčných bičíkovitých řas je česky známý jako pláštěnky a vyskytuje se ve stojatých vodách, půdě i ve sněhu. Buňky řas rodu *Chlamydomonas*, jež mají kruhovitý až elipsovitý tvar, mohou zřídka tvořit i jednoduché kolonie. Velkou část jejich buňky zaujímají chloroplasty a vakuola, která je propojena s bičíkem. Buněčnou stěnu tvoří celulóza, ale glykoproteiny a necelulózové polysacharidy.

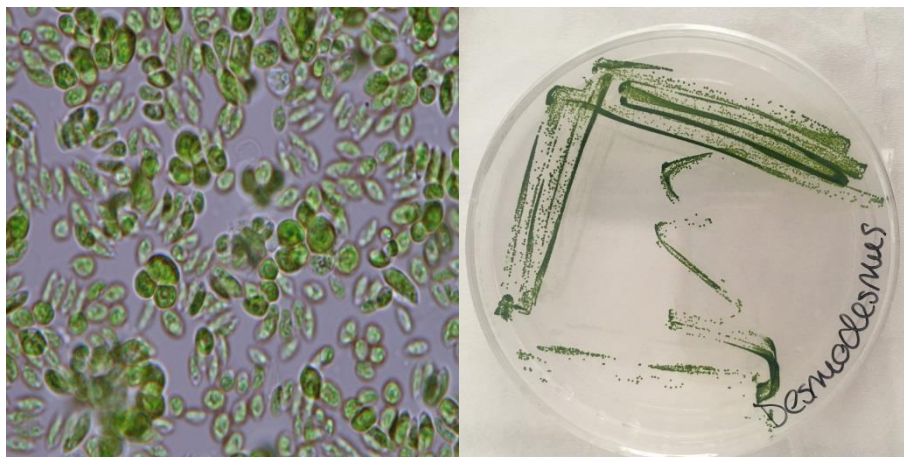
Zajímavostí tohoto rodu je, že ve svých buňkách obsahují iontové kanály. Ty se aktivují světlem a jejich úlohou je kontrola toku iontů přes membránu do buňky. Řasy rodu *Chlamydomonas* se využívají především jako modelový organismus ke studii pohyblivosti bičíků, dynamiky chloroplastu a genetiky. *Chlamydomonas reinhardtii* je jedním z nejvýznamnějších zástupců. Tato řasa je fakultativně heterotrofní a ve tmě ke svému růstu dokáže využít organický zdroj uhlíku [2, 5].



Obrázek 2 *Chlamydomonas reinhardtii*

2.1.3 Rod *Desmodesmus*

Rod *Desmodesmus* je jednou z nejčastěji se vyskytujících sladkovodních řas. Buňky těchto řas rostou jednotlivě nebo obvykle tvoří cenobia po čtyřech, osmi a šestnácti jednotkách. Samostatně roste při příznivých podmínkách jak nutričních tak světelných. Pokud ovšem tyto předpoklady nemá, vytváří právě tato cenobia. Rod těchto řas má velmi silnou buněčnou stěnu, kterou pokrývá slizový obal. Díky tomu jsou nestravitelné, a tímto jsou chráněny proti škůdcům. Momentálně je identifikováno 74 druhů zástupců tohoto rodu. Využití nachází například v kanalizačních čistících procesech, při produkci biopaliv jako je vodík, bionafta nebo bioethanol a v neposlední řadě slouží jako modelový organismus pro studium fotosyntézy [2, 5].



Obrázek 3 *Desmodesmus acutus*

2.1.4 Biologické účinky řas a jejich složek

Chemické složení řas je natolik komplexní, že dokáže poskytnout široké spektrum látek, které jsou pro lidské tělo důležité. Řasy obsahují kvalitní proteiny a lipidy, řadu esenciálních aminokyselin a nenasycených mastných kyselin, antioxidanty ve formě karotenoidů a chlorofylu, mnoho vitamínů, minerálních látek a stopových prvků. Všechny tyto složky přispívají ke správnému fungování těla, zvyšují imunitu, detoxikují organismus, snižují cholesterol, udržují optimální krevní tlak, podporují funkci trávicího ústrojí, optimalizují hodnotu pH, napomáhají při krvevorbě a regeneraci tkání.

Díky vysokému obsahu chlorofylu a dalších barviv je největším účinkem právě detoxikace organismu. Tyto látky jsou schopny navázat na sebe toxiny a podílet se na jejich vylučování z organismu. K tomu dopomáhá i řada vitamínů, především A, B, C a E. Vitamín C je nezbytný pro ochranu proti oxidačním procesům, zvyšuje obranyschopnost organismů a slouží k regeneraci vitamínu E. Skupina vitamínu B, která je označována jako B-komplex, jsou látky pro funkci metabolismu zcela nezbytné. Provitamín A a vitamín E zaujímají také funkci antioxidantů [6, 7].

2.2 Vybrané metabolity řas

Řasy jsou schopny produkce velmi širokého spektra látek. Tyto látky se pak dále využívají jako různé výživové doplňky jak lidí, tak zvířat, nebo ke krmným účelům. Některé mohou sloužit i jako biopaliva. Nutričně se řasy skládají z proteinů, lipidů, sacharidů, vitamínů, stopových prvků, pigmentů a antioxidantů.

2.2.1 Biomasa

Biomasa je souhrn všech organických látek tvořících těla organismů (rostlin i živočichů). Nejčastěji se využívá rostlinná biomasa, a to jako zdroj pro energetické účely. Mezi zdroje biomasy patří lesnický průmysl, rychle rostoucí rostliny, cukernaté a olejové plodiny, dřevní, zemědělské a průmyslové odpady. Získat ji lze i z přírodních vod a dále využívat jako hnojivo. Vysušený prášek řas zelené nebo červené barvy se ve formě pilulek užívá jako výživový doplněk. Biomasa je využívána k výrobě biopaliv. Jsou to nejčastěji kapalná paliva pocházející z obnovitelné biomasy. Pro životní prostředí jsou mírnější zátěží než klasická paliva vyrobená z ropy. Biopaliva jsou dělena do tří generací.

První generace biopaliv zahrnuje biomasu, která má potenciál být využívána v potravinářské produkci a potravinářským účelům. Zde se řadí např. methylestery řepkového oleje, bioethanol z cukernatých plodin a rostlinné oleje. Biopaliva druhé generace jsou vyráběna z lignocelulózové biomasy, patří k nim bioethanol a biomethanol z lignocelulózy a syntetická motorová nafta. Kvůli finančně nákladné produkci je jejich podíl na trhu ale minimální. Nejnovějším obnovitelným zdrojem energie jsou biopaliva třetí generace. Obrovský potenciál zde má výroba pohonných hmot z různých druhů fotosyntetizujících řas. Tyto organismy přeměňují sluneční energii na biomasu daleko efektivněji než vyšší rostliny a jsou poměrně nenáročné na prostředí a prostor.

Mezi hlavní výhody použití řas jako biopaliva třetí generace patří schopnost syntetizovat velké množství lipidů, možnost kultivace celoročně a všestranný růst v mořských i odpadních vodách. Bionafta vyrobená z řas je také vhodná do nižších teplot, její bod tuhnutí se pohybuje okolo 7 °C. Výhřevnost tohoto paliva je nepatrně nižší než u klasické nafty, tudíž měrná spotřeba zůstává podobná. Tato bionafta je vhodná i z hlediska provozního, díky správné míře kyselosti nezpůsobuje koroze součástek motorů a ucpávání čerpadla. Nejlepšího efektu se ale dosáhne smícháním dieselu a bionafty ve správném poměru [2, 3, 8, 9, 22, 23, 24].

2.2.1.1 Methylestery a ethylestery mastných kyselin

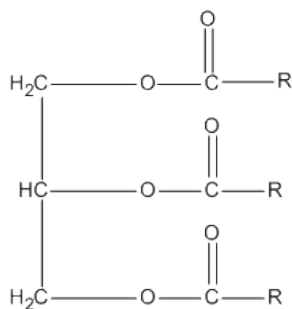
Tyto látky se používají jako bionafta neboli ekologické palivo pro vznětové motory. Vyrábí se pomocí transesterifikace, což je reakce alkoholu a mastné kyseliny za vzniku esteru mastné kyseliny a jiného alkoholu. K výrobě lze použít rostlinné oleje jako je slunečnicový, řepkový, palmový či sójový. Výhodou bionafty je lepší spalovací proces, při kterém vzniká menší množství emisí. Také je mastnější než klasická motorová nafta z ropy, což má za důsledek snížení opotřebení motoru a tím prodlužuje jeho životnost. Její další výhodou je netoxičita a snadná odbouratelnost [2, 8].

2.2.2 Lipidické látky

Lipidy jsou estery glycerolu a vyšších karboxylových kyselin jak nasycených tak nenasycených. Jsou to látky hydrofobní povahy nerozpustné ve vodě. V organismech mají hned několik funkcí, jsou důležitou součástí biomembrán, plní strukturní a obrannou funkci. Tuky se dělí na homolipidy a heterolipidy. Mezi homolipidy patří tuky, oleje a vosky, což jsou estery vyšších karboxylových kyselin. K heterolipidům patří fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny [6, 7, 10].

2.2.2.1 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou estery glycerolu a vyšších mastných kyselin. Jejich strukturu tvoří glycerol a tři molekuly mastných kyselin, které jsou navázány pomocí esterových vazeb na všech třech hydroxylových skupinách glycerolu. Pokud se na tyto esterové vazby působí enzymem lipázou, vazby se hydrolyzují a vznikají mastné kyseliny spolu s glycerolem. Triacylglyceroly se vyskytují ve všech rostlinných i živočišných tucích, jsou hlavní složkou lipoproteinů. Lze je štěpit pomocí transesterifikace na alkylestery mastných kyselin, které jsou využívány jako biopalivo [6, 7].

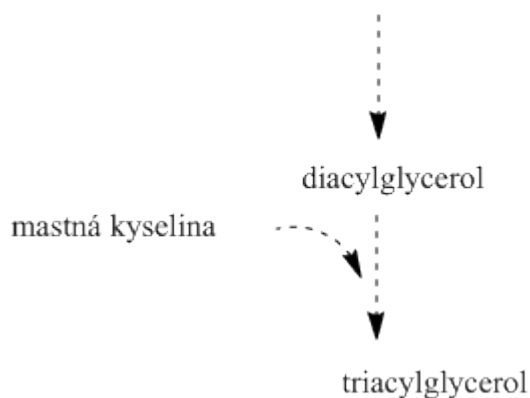


Obrázek 4 Triacylglycerol

2.2.2.2 Biosyntéza triacylglycerolů

Tato syntéza se uskutečňuje na endoplazmatickém retikulu buněk a vychází z připravených mastných kyselin a z aktivovaných forem glycerolu (glycerol-3-fosfát), získaných z glykolýzy. V první fázi dochází k přenosu dvou acylových zbytků mastných kyselin na glycerol-3-fosfát. Vznikne fosfatidát. Odštěpením fosfatové skupiny vzniká diacylglycerol. Ten reakcí s další aktivovanou molekulou mastné kyseliny poskytuje triacylglycerol [10].

2 molekuly mastné kyseliny + glycerol-3P



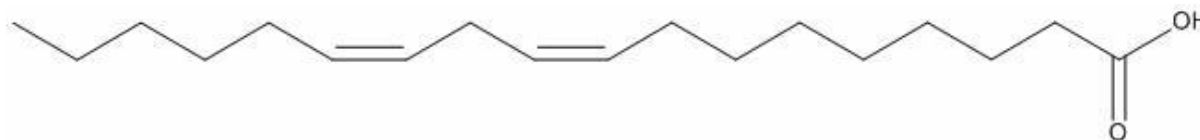
Obrázek 5 Schéma syntézy triacylglycerolu

2.2.2.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou základní stavební jednotkou lipidů. Jsou to nenasycené nebo nasycené karboxylové kyseliny s počtem uhlíků od 4 do 36. Mohou se lišit délkou a charakterem uhlíkového řetězce nebo přítomností substituentů. Obecně jsou nasycené mastné kyseliny pro zdraví nepříznivé, zatímco ty nenasycené jsou považované za příznivé a nezbytné. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA z anglického polyunsaturated fatty acids) jsou alifatické nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami, které bývají většinou nekonjugované. Některé z nich jsou esenciální, nemohou být tedy syntetizovány v lidském těle a musí být přijímány v potravě.

Omega-3 mastné kyseliny mají první dvojnou vazbu na uhlíku číslo tři od koncového methyly. Mezi tyto mastné kyseliny patří eikosapentaenová kyselina (EPA), α -linolenová kyselina (ALA), dokosahexaenová kyselina (DHA) a dokosapentaenová kyselina (DPA-3). Nejdůležitější je ALA, jejichž metabolickými produkty jsou EPA a DHA. Tyto kyseliny snižují riziko onkologických a kardiovaskulárních onemocnění. EPA se využívá ve farmacii. Potravinovým zdrojem těchto mastných kyselin jsou ryby, maso a semínka.

Omega-6 matné kyseliny mají dvojné vazby na šestém uhlíku od konce řetězce. Nejvýznamnější zástupci z těchto kyselin jsou kyselina linolová (LA), γ -linolenová kyselina (GLA), dihomogamma-linolenová kyselina (DHGLA) a arachidonová kyselina (AA). Kyselina linolová je základní produkovanou kyselinou, GLA, DHGLA a ARA jsou jejími metabolickými produkty. Tyto mastné kyseliny se nachází v rostlinných olejích (sójovém a slunečnicovém) [6, 7].

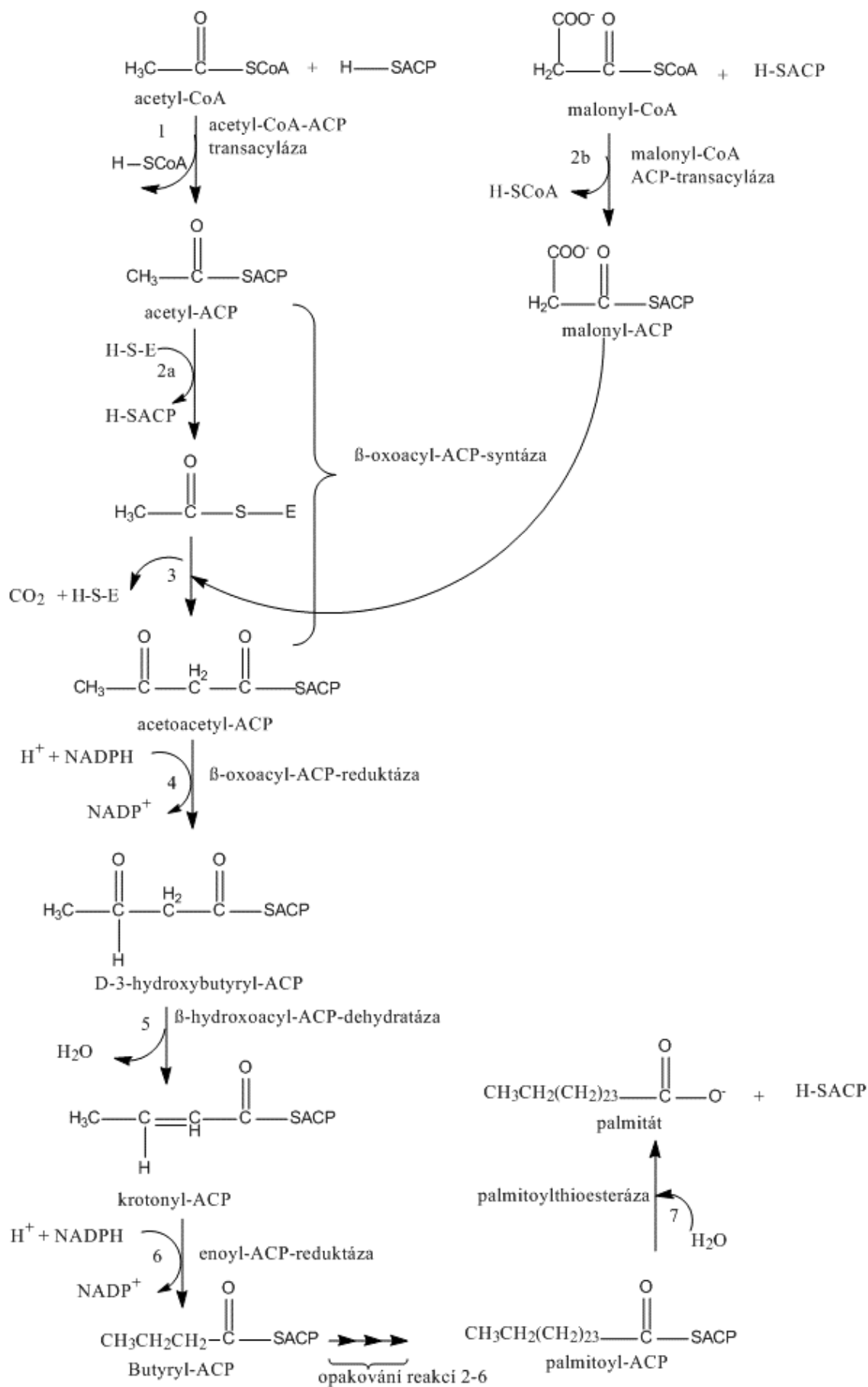


Obrázek 6 Kyselina linolová

2.2.2.4 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin probíhá v cytoplasmě buněk. Acetyl-CoA je výchozí látka pro biosyntézu mastných kyselin. Ten vzniká při odbourávání jiných mastných kyselin nebo při aerobním odbourávání sacharidů, případně aminokyselin. Acetyl-CoA se v prvním kroku pomocí enzymu acetyl-CoA-karboxylázy karboxyluje na malonyl-CoA za spotřeby ATP. Malonyl-CoA je poté převeden enzymem malonyl-CoA-transacetyláza na malonyl-ACP. Dále nastává kondenzační reakce mezi malonyl-ACP a acetyl-ACP (ten byl vytvořen z acetyl-CoA pomocí enzymu acetyl-CoA-transacetyláza) a vzniká acetoacetyl-ACP za uvolnění oxidu uhličitého.

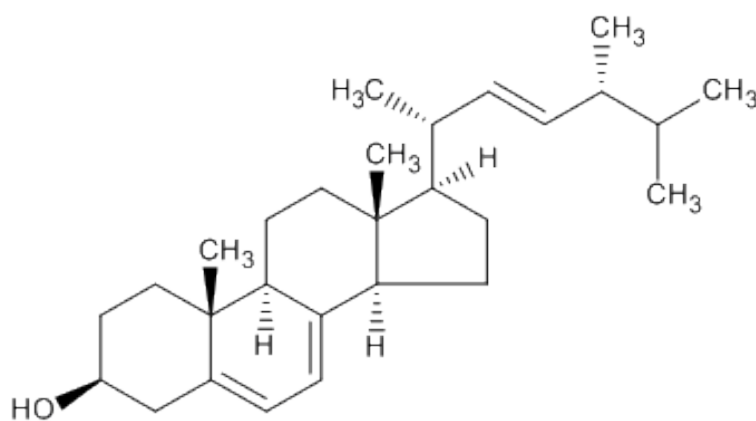
Acetoacetyl-ACP je dále redukován enzymem β -ketoacyl-ACP-reduktáza na β -hydroxybutyryl-ACP. β -hydroxybutyryl-ACP je dehydratován enzymem β -hydroxyacyl-dehydrogenáza na krotonyl-ACP. Následuje další redukce enzymem enoylreduktáza a vznikne butyryl-ACP. Takto se původní řetězec acetyl-CoA prodlužuje o další dva uhlíky. Stejným postupem poté dochází k dalšímu prodlužování řetězce. Až řetězec obsahuje šestnáct uhlíků, nastane konec a produktem je kyselina palmitová. Tu lze pomocí enzymatických reakcí transformovat na další mastné kyseliny. Pro syntézu palmitátu je zapotřebí 8 molekul acetyl-CoA, 7 molekul ATP a 14 molekul NADPH [10].



Obrázek 7 Syntéza kyseliny palmitové [10]

2.2.3 Steroly

Steroly jsou organické látky s hydroxylovou skupinou, jsou odvozeny od perhydro-1,2-cyklopentanofenanthrenu. Rostlinné steroly se označují jako fytosteroly, živočišné pojmem zoosteroly. Steroly mohou reagovat s vyššími mastnými kyselinami za vzniku esterů. Steroly jsou základní součástí plazmatických membrán eukaryotických buněk a mají velký vliv na fyzikální a chemické vlastnosti lipidové dvojvrstvy tím, že zajišťují fluiditu a permeabilitu a stabilizují metabolismus. Ergosterol je steroidní látka eukaryotického původu. Obsažen je v některých rostlinách, ale především v mikroorganismech. Vlivem působení ultrafialového záření se otevře kruh se dvěma dvojnými vazbami a vzniká ergokalciferol a cholekalciferol. Tyto látky jsou označovány jako vitamín D₂ a D₃. Jsou důležité pro správné fungování v metabolismu a hojně využívané ve farmacii a výživových doplňcích [6, 10].



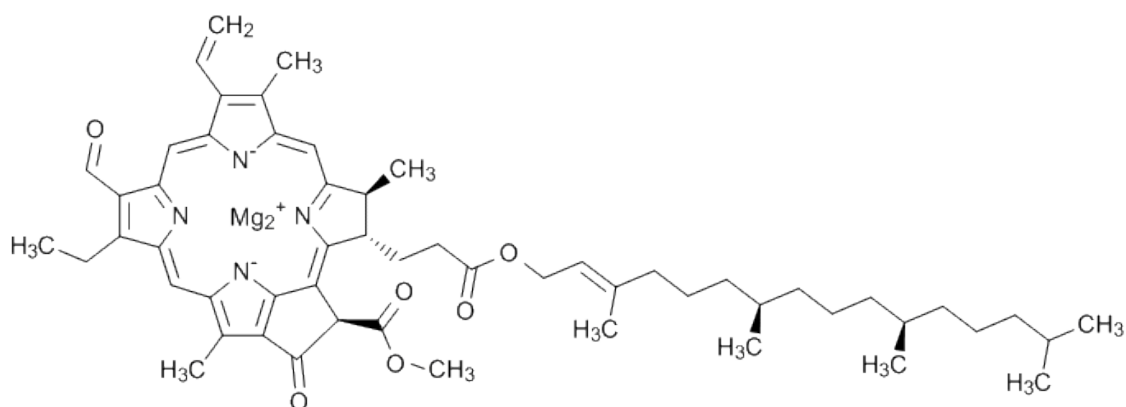
Obrázek 8 Ergosterol

2.2.4 Pigmenty a antioxidanty

Řasy produkují velké množství pigmentů, mezi které patří chlorofyly, karotenoidy, flaviny, melaniny a další pigmenty, které jsou už více specifické. Pigmenty jsou biologicky aktivní látky a také významné biotechnologické produkty.

2.2.4.1 Chlorofyl

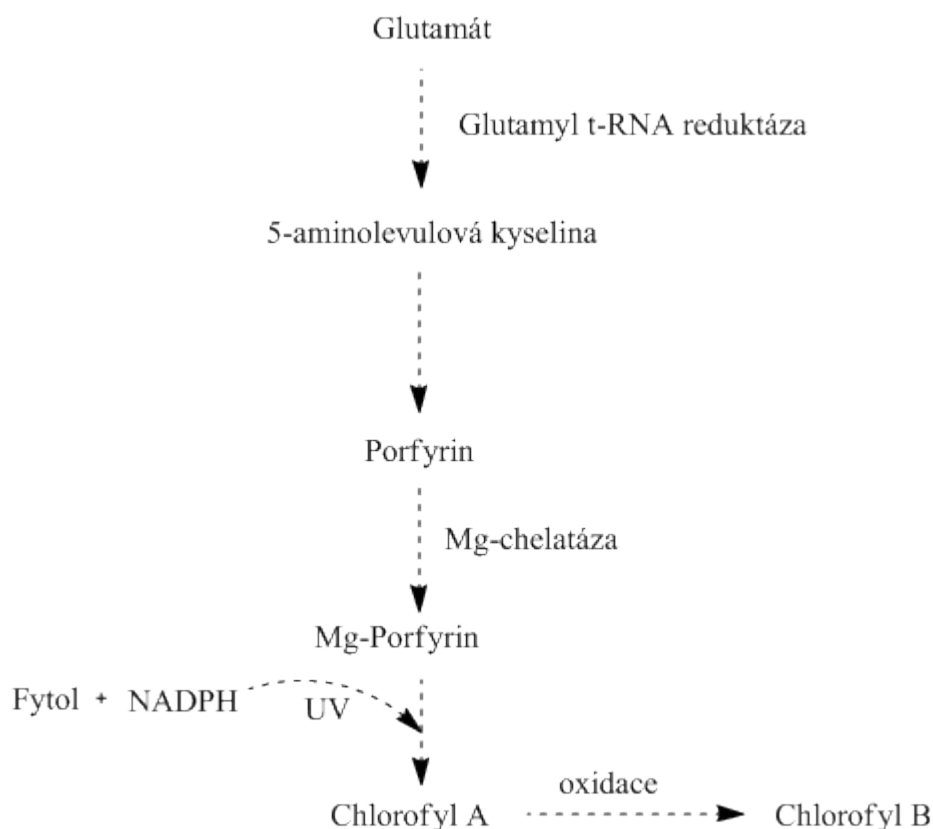
Chlorofyl je důležitý zelený pigment, který se nachází u eukaryotických organismů v chloroplastech. Toto barvivo je nezbytné pro fotosyntézu, probíhá na něm absorpce světelného záření. Chlorofyl, který je obsažen v řasách, je typu A a B. Chlorofyl typu A je spíše zelenomodré barvy, typ B má barvu žlutozelenou. Tento pigment a jeho deriváty se využívají do různých krmných směsí pro zvířata. Důležitý je v medicínském odvětví, kde se používá jako prevence nádorových onemocnění. Jeho směs s kyselinou hyaluronovou je účinná k hojení ran. Lze jej použít i jako potravinářské barvivo [6, 10].



Obrázek 9 Chlorofyl A

2.2.4.2 Biosyntéza chlorofylu

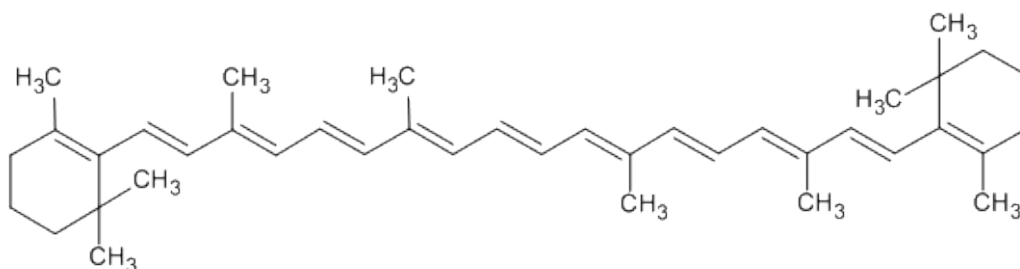
Pro syntézu chlorofylu je důležité připojení glutamátu na tRNA a následný vznik glutamyl-tRNA, který se postupně přeměňuje na glutamyl-1-semialdehyd, dále pak na kyselinu 5-aminolevulovou, a ta poté na porfobilinogen, obsahující pyrolové jádro. Čtyři tyto jednotky se formují do porfyrinu. Do něj se pomocí příslušných enzymů zabudovává hořčík. Následuje fotochemická reakce, kde se spotřebují dva fotony, jedno NADPH a připojí se fytol. Výsledkem je chlorofyl A, který se může oxidovat za vzniku chlorofylu B [10].



Obrázek 10 Syntéza chlorofylu [10]

2.2.4.3 Karotenoidy

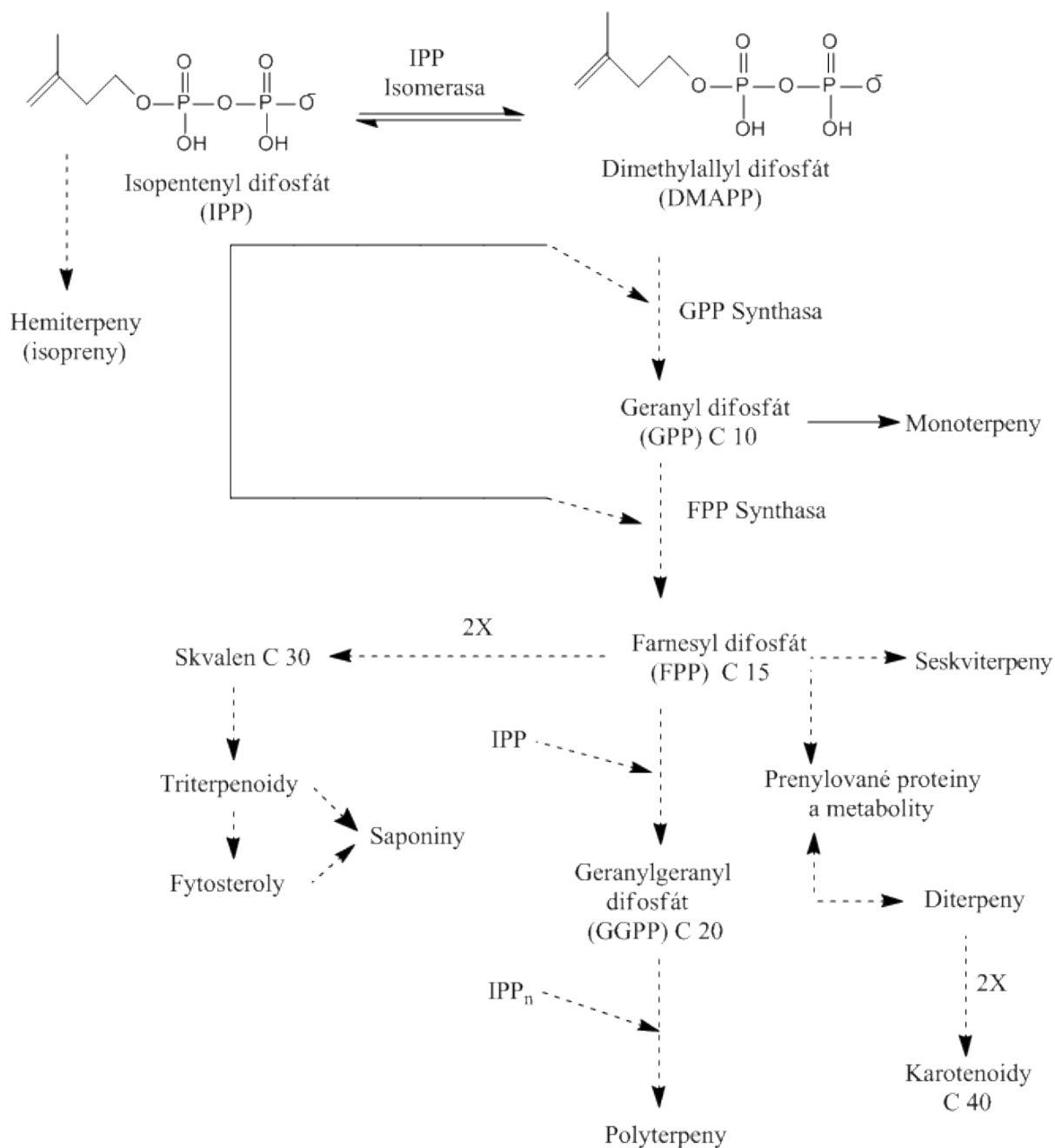
Karotenoidy jsou bezdušikaté organické látky spadající do skupiny terpenů. Tyto pigmenty jsou nepolární molekuly, které se vyskytují spolu s chlorofylem v chloroplastech. Působí jako sekundární anténní systémy a také chrání buňku před poškozením slunečními paprsky. Mají výrazné antioxidační účinky, využívat se mohou ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, pomáhají při léčbě rakoviny a pozitivně ovlivňují funkci kardiovaskulární i nervové soustavy. Můžou být červené, oranžové a žluté. Podle obsahu kyslíku ve své molekule se tedy dělí do dvou skupin, které se odlišují zbarvením. Karoteny ve své molekule nemají kyslík a představují červené pigmenty. Xantofyly obsahují kyslík a vystupují jako žluté pigmenty. Xantofyly vznikají oxidací karotenů, jejich prekurzorem je β -karoten. Z karotenů je nejznámější β -karoten a α -karoten, které vznikají cyklizací z Ψ -karotenů [6, 7].



Obrázek 11 β -karoten

2.2.4.4 Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy v přírodě většinou obsahují 40-ti uhlíkovou kostru s dvojnými vazbami. Acetyl-CoA je klíčovou molekulou pro syntézu karotenoidů, získáván je z β -oxidace mastných kyselin nebo z aerobního odbourávání sacharidů. Karotenoidy jsou syntetizovány v jedné z větví izoprenoidní dráhy. V prvním úseku biosyntézy se acetyl-CoA mevalonátovou dráhou přemění přes meziprodukt kyselinu mevalonovou na isopentenylpyrofosfát. Kondenzací jeho dvou jednotek hlava k patě vzniká geranylpyrofosfát a další kondenzací těchto dvou molekul hlava k patě pak geranylgeranylpyrofosfát. Následující krok je kritický, kondenzací dvou molekul geranylgeranylpyrofosfátu hlava k hlavě vzniká fytoen, první C40 acyklický karotenoidní skelet. Ten podstupuje řadu desaturačních a cyklizačních reakcí a vzniká lykopen s 11 nenasycenými vazbami. Postupně z něj vznikají další barevné karoteny a xantofyly [10].



Obrázek 12 Schéma syntézy karotenoidů [10]

2.3 Kultivace řas

Řasy lze kultivovat téměř kdekoliv, a to i s malými požadavky na energii a velmi malým množstvím živin. Ideální podmínky pro růst řas jsou ale kmenově specifické. Na kultivaci mikrořas má vliv několik faktorů, které ovlivňují produkci biomasy. Mezi tyto faktory patří kultivační medium a obsah živin v něm, dále teplotní podmínky a parametry světla, hodnota pH a salinita, v poslední řadě i typ kultivační nádoby. Na kultivaci působí i hydrodynamické podmínky a promíchávání média, bez kterých by se řasy usazovaly a jejich příjem živin a světla by byl nerovnoměrný [8, 11, 12, 21, 25].

2.3.1 Kultivační metody

Řasy se mohou kultivovat jak ve vnitřním tak ve venkovním prostředí. Pokud jsou kultivovány ve vnitřním prostředí, je kontrolováno hned několik faktorů, jako je teplota, světlo, médium a další uvedené výše. Ve venkovních podmínkách se řasy kultivují v prostředí rybníků, přehrad a vodních nádrží. Tyto systémy jsou pro kultivaci mnohem levnější. Jejich nevýhodou je, že neumožňují přesné kontrolování podmínek a tudíž může docházet ke kontaminaci jinými mikroorganismy. Technicky se kultivační metody dělí na kontinuální, semikontinuální a vsádkové [11, 12, 26].

2.3.1.1 Druhy kultivace

Autotrofní kultivaci se rozumí každá kultivace, kdy se kultura pěstuje pod osvětlením, jak přírodním či umělým. Jako zdroj uhlíku je zde oxid uhličitý, který se přivádí do systému. U kultivací heterotrofních roste kultura bez přístupu světla. Zdrojem uhlíku bývá nějaká organická forma, jako například sacharidy (glukóza) nebo i kyselina octová. Tohoto způsobu kultivace jsou ale schopny jen některé druhy řas. Mixotrofní způsob kultivace je kombinací autotrofní a heterotrofní kultivace. Kultura je pěstována pod osvětlením, zdroj uhlíku je zároveň anorganického i organického původu [11, 12].

2.3.2 Vliv kultivačních podmínek

Kultivační podmínky jsou pro řasy velmi důležité a odvíjí se od nich schopnost růstu buněk a produkce jak primárních tak i sekundárních metabolitů.

2.3.2.1 Médium

Médium je jedním z faktorů, které kultivaci řas ovlivňují. Nejčastěji se v laboratorní praxi uplatňuje médium BBM (Bold's basal medium). Toto médium je základní a běžně využívané. Dalším často užívaným médiem je BG11 (Blue-green 11). Složení tohoto média je podobné médiu BBM, jen se liší v poměrech obsažených prvků a je obohacené o další minerální látky. Obě tyto média jsou vhodná pro kultivaci sladkovodních řas. Složení médií je popsáno v tabulce (Tabulka 1) [13, 14, 15].

2.3.2.2 Teplota

Teplota je důležitý faktor ovlivňující všechny probíhající chemické reakce, růst řas a jejich metabolismus. Změna teploty může ovlivnit biochemické složení buněk, hlavně podíl lipidů a bílkovin. Řasy mají poměrně širokou teplotní toleranci. Optimální teplota pro kultivaci řas se pohybuje v rozmezí cca od 15 °C až do 35 °C, liší se v závislosti na druhu řasy a vybraném médiu. Při těchto teplotách dochází k optimálnímu růstu a množení buněk. Při teplotách nižších než 15 °C dochází k výraznému snížení růstu buněk. Naopak když je teplota nad 35 °C, má pro mnohé buňky letální účinky [13, 14, 15].

2.3.2.3 Světlo

Světlo je pro řasy nezbytné v průběhu fotosyntézy. Jako zdroj světla může být použito umělé ozáření v podobě různých zářivek emitujících červené a modré spektrum světla, které se z největší míry účastní fotosyntézy. Přírodní zdroj světla je sluneční záření. Různé parametry světla jako je jeho intenzita, vlnová délka nebo kvalita mohou být nastavovány a upravovány pomocí speciálních filtrů. Nadměrné ozáření může taktéž vyvolat poškození fotosystému a inhibici růstu buněk [13, 14, 15].

2.3.2.4 Hodnota pH

Optimální hodnota pH pro kultivaci řas je rozdílná pro jednotlivé rody a druhy řas. Obecně se uvádí rozsah pH od 7 do 9. To znamená, že řasy ke svému růstu vyžadují mírně zásadité prostředí. Některé druhy ale mohou ke svému růstu potřebovat i kyselé pH. Při vyšších výkyvech než je optimální hodnota pH dochází ke zničení celé kultury [13, 14, 15].

2.3.2.5 Salinita

Salinita určuje obsah minerálních látek a solí. Dá se říci, že řasy jsou v tomto ohledu nadmíru tolerantní. Optimální koncentrace solí je 2 g/l. Nicméně při extrémní koncentraci solí v médiu se jejich růst výrazně zpomaluje [13, 14, 15].

2.3.2.6 Kultivační nádoby

Řasy se obvykle kultivují v nádobách z borokřemičitanového skla. Tyto nádoby musí být světelně propustné a měly by být snadné na údržbu (čištění a sterilaci). Použitý materiál musí být netoxický a chemicky inertní [13, 14, 15].

2.4 Metody analýzy biomasy a metabolitů

Ke stanovení biomasy a látek vyprodukovaných řasami se nejčastěji používají moderní separační techniky jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie a plynová chromatografie.

2.4.1 Extrakce

Extrakce je separační metoda založená na přechodu složky mezi dvě nemísitelné fáze. Existuje celá řada typů extrakce, nejčastější je ale extrakce složky v pevné či kapalně fázi do jiné kapalně fáze. Sledované lipidické látky a karotenoidy jsou nepolární povahy. K jejich izolaci z řasové biomasy je nezbytné porušit strukturu buňky [16, 17].

2.4.2 Transesterifikace

Transesterifikace je v organické chemii reakce, při které dojde k záměně uhlovodíkových řetězců mezi alkoholem a esterem mastné kyseliny. Tuto reakci lze katalyzovat bazickými či kyselé nebo přidávkou příslušných enzymů [18].

2.4.3 Absorpční spektrofotometrie

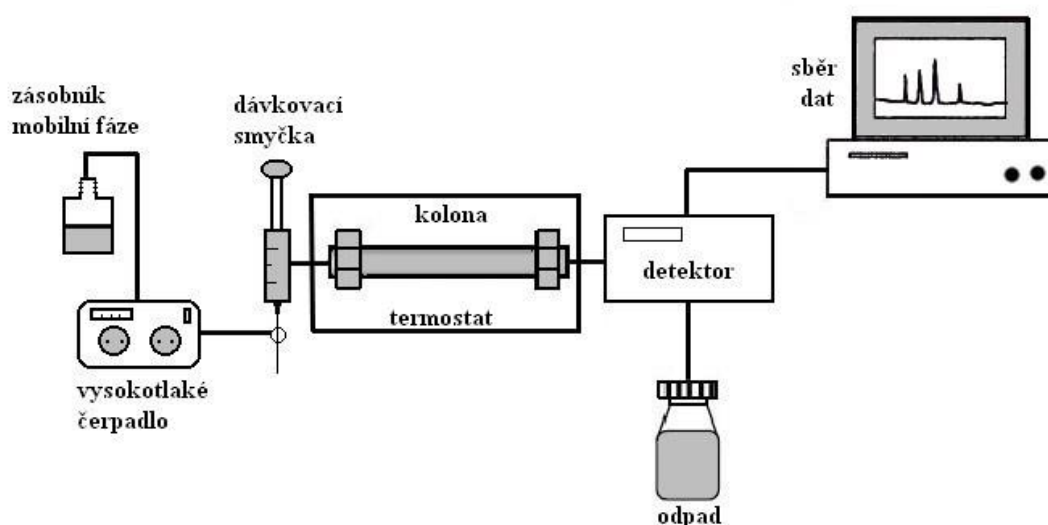
Absorpční spektrofotometrie je analytická metoda založená na absorpci viditelného nebo ultrafialového záření roztoku molekul vzorku. Při absorpci záření molekulami dojde k excitaci valenčních elektronů. Chlorofyl obsažený v zelených řasách absorbuje ve viditelné oblasti záření při vlnové délce 680 nm. Zdrojem viditelného záření ve spektrofotometru jsou wolframové a halogenové žárovky absorpčním prostředím je květa z plastu nebo z křemenného skla se samotným vzorkem [19].

2.4.4 Chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda, při které dochází k dělení složek obsažených ve vzorku. Většinou se používá pro kvantitativní i kvalitativní analýzu látek. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Na začátek stacionární nepohyblivé fáze se umístí vzorek, který je pohybem mobilní fáze unášen. Složky vzorku jsou postupně zachycovány ve stacionární fázi, na konec stacionární fáze se dostávají složky nejméně zadržované s největší afinitou k mobilní fázi [19, 20].

2.4.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda. Její princip spočívá v pohybu vzorku mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází při této metodě je vždy kapalina a stacionární fází může být tuhá látka či kapalina ukotvena na tuhém nosiči. Stacionární fáze je umístěna v náplňové koloně ve formě sorbentu, kterým protéká mobilní fáze. Za vysokého tlaku je mobilní fáze pomocí čerpadla přiváděna do systému. Pro umožnění distribuce mezi mobilní a stacionární fází, musí existovat fázové rozhraní. Mezi mobilní a stacionární fází dochází při dělení látek k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek. Distribuce složek se popisuje distribuční konstantou. Čím je tato hodnota vyšší, tím déle zůstávají molekuly dané látky ve stacionární fází a jejich retence je větší. Separované zóny vzorku, které vychází z kolony, se zaznamenávají detektorem. Signál z detektoru se převede na chromatogram a vyhodnotí se [19, 20].



Obrázek 13 Schéma HPLC [19]

2.4.4.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie taktéž spadá do separačních metod, hojně využívaná je k separaci látek s nízkým bodem varu. Mobilní fází je zde nosný plyn, který nijak nesmí interagovat se vzorkem. Využívají se plyny jako vodík, dusík a hélium. Vzorek je dávkován do proudu tohoto plynu a v koloně se složky vzorku separují na základě různé afinity se stacionární fází. Kolony u této metody mohou být buď náplňové, nebo kapilární. Složky opouštějící kolonu identifikuje detektor a jeho signál se převeden na chromatogram [20].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo charakterizovat růst, metabolickou aktivitu a využití vybraných druhů řas. V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- Screening a kultivace vybraných druhů řas.
- Izolace, charakterizace a kvantifikace řasové biomasy a extrakce vybraných metabolitů.
- Biologické účinky řas a jejich složek.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pro kultivaci řas a sinic

Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina citronová p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Na₂-EDTA.2H₂O p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
(NH₄)₅Fe(C₆H₄O₇)₂ p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Uhlíčan sodný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid železitý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Kyselina boritá p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Chlorid zinečnatý p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Vitamin B12, Sigma-Aldrich (SRN)
Chlorid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)

4.1.2 Chemikálie použité pro extrakce

Methanol p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Chloroform p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.1.3 Chemikálie použité pro HPLC a GC

Methanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Chloroform pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)
Hydroxid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Hexan HPLC, Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

4.2.1 Přístroje a pomůcky pro kultivaci

Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (GB)

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)

GKB Color Digital CCD kamera (Tchaiwan)

Třepačka Yellow line, (SRN)

Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)

Analytické váhy Boeco (SRN)

Box Aura mini BioTech (ČR)

Kultivátor Multi-Cultivator MC 1000-OD PSI Drásov (ČR)

Stojan pro 8 zkumavek 80 ml

Termostat s vodní lázní

Vzduchová pumpa

Zásobník na destilovanou vodu

Detektor optické hustoty – detekce při 680 nm a 720 nm

LED diodový zdroj pro každou zkumavku

4.2.2 Přístroje a pomůcky pro izolaci a analýzu látek

HPLC/PDA sestava:

Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)

Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR

Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR

Vyhodnocovací systém Xcalibur

Kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm,

Phenomenex Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)

Předkolona - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex

TRACE GC/FID (ThermoQuest S.p.A., Itálie)

Kapilární kolona DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm

Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)

Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

4.3 Požité kmeny řas

Chlorella vulgaris CCALA 924

Chlamydomonas reinhardtii CCALA 974

Desmodesmus acutus CCALA 437

4.4 Kultivace řas

Kultivace řas byla prováděna v Erlenmeyerových baňkách nebo v multikultivátoru, což je fotobioreaktor s větším počtem paralelně zapojených kultivačních nádob. Řasy byly kultivovány v kapalných médiích, za laboratorní teploty a neustálého vzdušnění a osvětlení. Řasová média jsou zároveň inokulační i produkční. Připravují se ze zásobních roztoků solí. Jejich sterilování probíhalo v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu dvou hodin. Inokula byla připravena následujícím způsobem. Do vysterilované Erlenmeyerovy baňky s médiem byla sterilně zaočkována kultura vybrané řasy ze zásobní Petriho misky s tuhým médiem. Vzorek inokula byl sterilně odebrán, byla změřena absorbance a kultura řas byla zaočkována do produkčního média tak, aby absorbance vzniklého roztoku blížila hodnotě $A=0,1$.

Tabulka 1: Složení dvou základních kultivačních médií pro řasy

Médium	BBM	BG11
Složka	[g/l]	[g/l]
NaNO ₃	1,496	0,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0748	0,075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036	0,025
Kyselina citrónová	0,006	-
Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	0,00123	4,5 · 10 ⁻³
(NH ₄) ₅ Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂	0,006	-
Na ₂ CO ₃	0,02	-
NaCl	-	0,01
K ₂ HPO ₄	0,0305	0,075
KH ₂ PO ₄	-	0,175
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	5,82 · 10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	0,00286	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 · 10 ⁻⁴	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81 · 10 ⁻³	2,46 · 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,9 · 10 ⁻⁴	2,4 · 10 ⁻⁵
CuSO ₄ ·5H ₂ O	7,9 · 10 ⁻⁵	-
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	4,9 · 10 ⁻⁵	-
ZnCl ₂	-	3 · 10 ⁻⁵
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	1,2 · 10 ⁻⁵

4.4.1 Autotrofní kultivace v multikultivátoru

Pro tuto kultivaci bylo do sterilních zkumavek nalito 80 ml naředěného vybraného produkčního média s vybranou kulturou řas s OD 0,1. Takto připravené zkumavky byly vloženy do multikultivátoru s vytemperovanou lázní na laboratorní teplotu. Bylo nastaveno osvětlení, individuální pro každou zkumavku. Intenzita osvětlení byla od 50 μ E do 400 μ E s krokem 50 μ E. Růst byl sledován pomocí programu OD view do dosažení stacionární fáze. Doba kultivace se pohybovala obvykle kolem 140 hodin. Poté byla kultivace ukončena a následoval odběr vzorků. Z každé zkumavky se odebíral vzorek kultury na stanovení celkové biomasy, ten činil 20 ml a na stanovení karotenoidů a lipidů, jeho objem činil také 20 ml. Vzorky byly centrifugovány při 4000 otáčkách po dobu 4 minut, supernatant byl slit a následovalo uchování v mrazicím zařízení při teplotě -40 °C.



Obrázek 14 Kultivátor MC 1000

4.4.2 Heterotrofní a mixotrofní kultivace

Pro tyto typy kultivací byla připravena dvě základní média (BBM a BG11) a k nim byla přidána glukóza, tak aby vznikl 2, 5 a 7% roztok. U médií s obsahem glycerolu byla navážka glycerolu přepočítaná tak, aby poskytovala stejné množství uhlíku jako média s glukózou. Složení všech těchto médií je uvedeno v tabulce (Tabulka 2). Z připravených inokul byly sterilně zaočkovány řasy do těchto připravených vysterilovaných médií o objemu 50 ml, tak aby jejich výsledné OD bylo 0,1. Při heterotrofní kultivaci Erlenmeyerovy baňky byly zabaleny do alobalu, aby se zabránilo přístupu světla. Kultivace probíhaly celkem 168 hodin na třepačce při laboratorní teplotě. Během kultivace byl proveden jeden odběr vzorku po 96 hodinách od začátku kultivace.

Tabulka 2 Složení médií pro heterotrofní a mixotrofní kultivace

médium		BBM	BG11
		koncentrace [g/100 ml média]	
1.	glukóza 2%	2,00	2,00
2.	glukóza 5%	5,00	5,00
3.	glukóza 7%	7,00	7,00
1.	glycerol 2%	2,05	2,05
2.	glycerol 5%	5,11	5,11
3.	glycerol 7%	7,16	7,16

4.4.3 Velkoobjemová kultivace

Do dvoulitrových lahví bylo sterilně zaočkováno řasové inokulum na výslednou optickou hustotu 0,1. Kultury řas v těchto lahvích byly kultivovány autotrofně při laboratorní teplotě za neustálého vzdušnění. Kultivace probíhala do nárůstu biomasy. Poté se celý objem kultury centrifugoval při 4000 otáčkách za minutu po dobu 4 minut, supernatant byl slit a následovalo uchování v mrazicím zařízení při -40 °C. Po vyjmutí se vzorky vložily do lyofilizačního zařízení, kde byly mrazem vysušeny. Takto připravený vzorek byl uchován při teplotě -80 °C a připraven na další experimenty.

4.5 Izolace, stanovení, analýza řasové biomasy a vybraných metabolitů

4.5.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Odebraný vzorek byl centrifugován při 4000 otáčkách 4 minuty, supernatant byl slit a buňky byly promyty destilovanou vodou a opět centrifugovány. Řasová biomasa byla rozsuspendována ve 2 ml destilované vody a kvantitativně převedena do předem zvážené kovové misky. Misky byly vloženy do sušárny s teplotou 75 °C a byly sušeny 24 hodin. Poté byly vyjmuty a umístěny do exsikátoru. Po ochlazení byly misky s biomasou zváženy a z rozdílu hmotností byla spočítána celková hmotnost biomasy.

4.5.2 Izolace dle Folche

Do rozmraženého centrifugovaného vzorku bylo odpipetováno 10 ml Folchova roztoku (chloroform:methanol 2:1). Byly přidány 2 lžičky skleněných kuliček a směs byla ponechána na vortexu za intenzivního protřepávání po dobu 30 minut. Po uplynutí byl vzorek přelit do malé centrifugační zkumavky a ke skleněným kuličkám bylo odpipetováno 2 ml směsi dle Folche a vzorek byl promyt. Tyto 2 ml byly opět přidány do zkumavky. Ke vzorku se odpipetovaly 2 ml destilované vody. Následovala centrifugace při 7000 otáčkách 5 sekund. Spodní vrstva vzorku obsahující extrakt v chloroformu byla odpipetována do slzičkové baňky a byla odpařena na vakuové odparce. Vzorek byl rozpuštěn ve 2 ml chloroformu a přes filtr 20 µm přefiltrován do Eppendorfovy mikrozkuavky. Takto připravený vzorek byl uložen v mrazicím zařízení při teplotě -40 °C pro další analýzu.

4.5.3 Analýza karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Analýza probíhala na HPLC sestavě od firmy Thermo Fischer Scientific. Analýza probíhala na nepolární koloně C 18 od firmy Kinetex. Jako mobilní fáze byla využívána směs o složení 80 % acetonitrilu, 15 % methanolu a 5 % chloroformu o potřebné čistotě, eluce byla izokratická. Během separace byl nastaven průtok 1000 µl/min a kolona byla vyhřátá na teplotu 45 °C. Jako detektor byl použit detektor diodového pole. Vzorek byl na kolonu dávkován ventilem s dávkovací smyčkou o objemu 20 µl. Na zpracování výsledných chromatogramů byl využit software Xcalibur.

4.5.4 Transesterifikace lipidů

Do skleněné vialky bylo odpipetováno 4,5 ml hexanu, 500 µl chloroformového vzorku, který obsahuje extrahované lipidické látky a 500 µl 2M roztoku KOH v methanolu. Směs byla důkladně protřepávána po dobu 8 minut. Následně byla směs ponechána v klidu po dobu 10 minut, aby se rozdělily jednotlivé fáze. Z horní fáze obsahující methylestery mastných kyselin v hexanu byl odpipetován 1 ml do vialky. Následovala analýza pomocí plynové chromatografie.

4.5.5 Analýza lipidů

Analýza probíhala na plynovém chromatografu THERMO TRACE GC s autosamplerem. K detekci analytu byl použit plamenově ionizační detektor. Analýza probíhala celkem 60 minut a měla tyto podmínky:

- kolona ZB – WAXplus 30 m délky
- rozpouštědlo – hexan GC kvality
- průtok plynů – 350 ml/min vzduchu, 35 ml/min vodíku a 30 ml/min dusíku
- FID detektor – teplota 275 °C
- Teplotní rampa: 60 °C po dobu 5 minut.
 1. rampa: 12 °C za minutu do 200 °C s výdrží 10 minut
 2. rampa: 5 °C za minutu do 220 °C s výdrží 15 minut
 3. rampa: 10 °C za minutu do 240 °C s výdrží 2 minut

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledky kultivací řasy *Chlorella vulgaris*

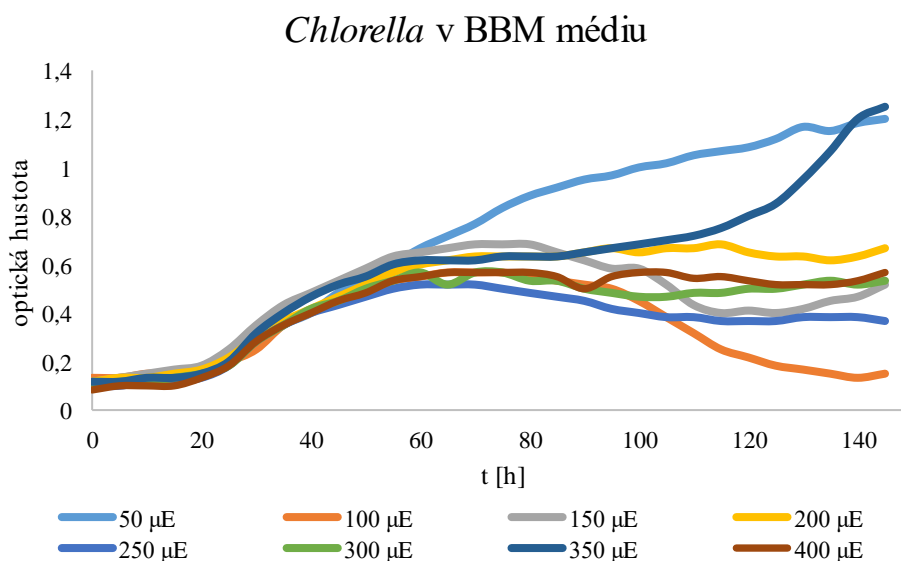
Bylo vyzkoušeno celkem 28 různých kultivací řasy *Chlorella vulgaris*, z toho 16 autotrofních na dvou různých médiích a při různém osvětlení. Dále bylo provedeno 6 heterotrofních a 6 mixotrofních kultivací, pro které bylo vybráno BBM médium s dvěma různými zdroji uhlíku a jejich třemi procentuálními zastoupeními. *Chlorella* nebyla schopna růstu na všech BBM médiích s přidavkem glukózy a mixotrofního způsobu kultivace a mělo to pro ni letální efekt.

5.1.1 Autotrofní kultivace

Autotrofní kultivace byly prováděny v multikultivátoru při neustálém vzdušnění a individuálním osvětlení od 50 μE do 400 μE s krokem 50 μE . Teplota kultivace byla 25 °C.

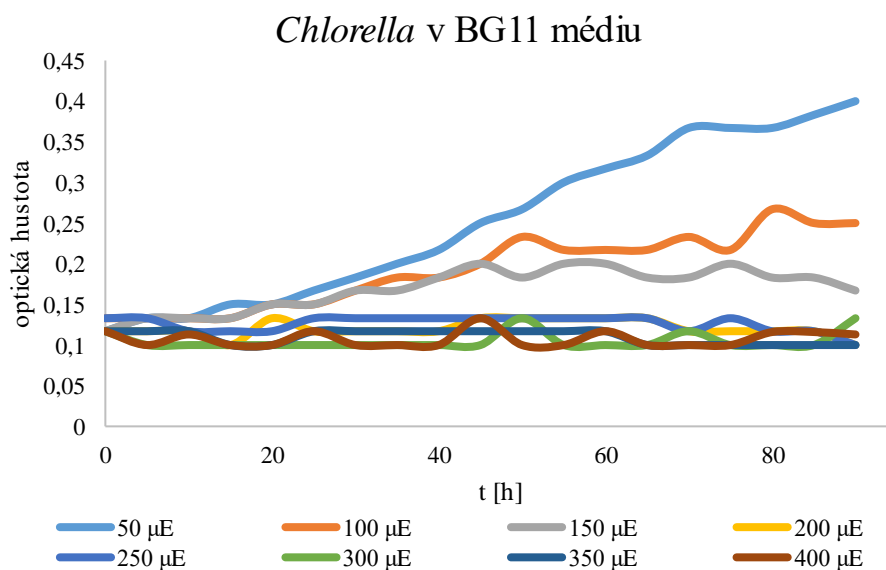
5.1.1.1 Růstové křivky

Během kultivace byla nepřetržitě sledována optická hustota při 680 nm. Z těchto hodnot byly dále v programu MS Excel sestaveny růstové křivky. Jak lze vidět v grafu (Obrázek 15), největší optické hustoty dosahovala *Chlorella* kultivovaná v BBM médiu při osvětlení 350 μE a 50 μE . Nejmenší nárůst byl pozorován při osvětlení 100 μE a 250 μE . Při těchto dvou osvětleních se kultury dostaly do stacionární fáze již kolem 80 hodiny kultivace, proto později už mohlo docházet k jejich odumírání.



Obrázek 15 Růstová křivka – *Chlorella* v BBM médiu

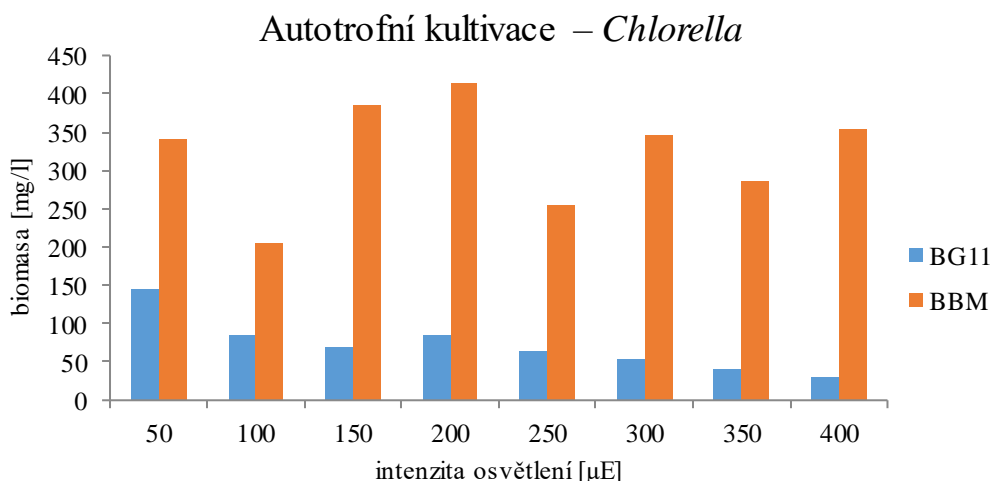
Jak si lze všimnout z grafu (Obrázek 16), kultivace kmene *Chlorella* v BG11 médiu byla oproti BBM médiu méně vhodná, pokud jde o dosaženou optickou hustotu. Nejvyšší nárůst byl pozorován při osvětlení 50 μE , který měl hodnotu OD 0,4. Při osvětlení 200 μE a více se řasa téměř nemnožila a její OD se pohybovala stále kolem hodnoty 0,1.



Obrázek 16 Růstová křivka – *Chlorella* v BG11 médiu

5.1.1.2 Stanovení celkové biomasy

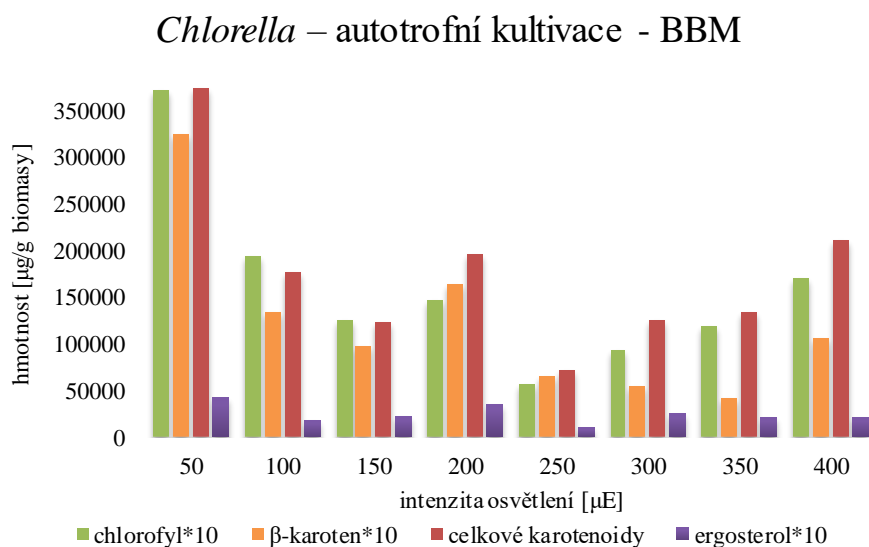
Po skončení kultivace, která trvala u BBM médiu přibližně 145 hodin a u BG11 média 90 hodin, byla od každého vzorku gravimetricky stanovena hmotnost celkové biomasy dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.1. Z grafu (Obrázek 17) je patrné, že největší nárůst biomasy při autotrofním způsobu kultivace *Chlorella* dosahovala v BBM médiu při osvětlení 200 µE, dále pak při 150 µE a 400 µE. Nejmenší výnos biomasy byl při všech kultivacích na BG11 médiu, což je patrné iz růstových křivek uvedených výše. Hmotnost biomasy u kultivací na BG11 médiu byla vždy minimálně o polovinu nižší než u kultivací na BBM médiu. Největší hodnota u kultivací na BG11 médiu nedosahovala ani 150 mg/l.



Obrázek 17 Celková biomasa u autotrofních kultivací řasy *Chlorella*

5.1.1.3 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Po ukončení všech kultur byl vždy z každé zkumavky odebrán vzorek, který byl následně vyextrahován a analyzován pomocí metody HPLC s PDA detekcí postupem uvedeným v kapitole 4.5.3. Sledovány byly celkové karotenoidy, β -karoten jakožto hlavní pigment ze skupiny karotenů, dále pak chlorofyl jako typické barvivo pro fotosyntetizující organismy a v poslední řadě i ergosterol sloužící jako provitamin D.

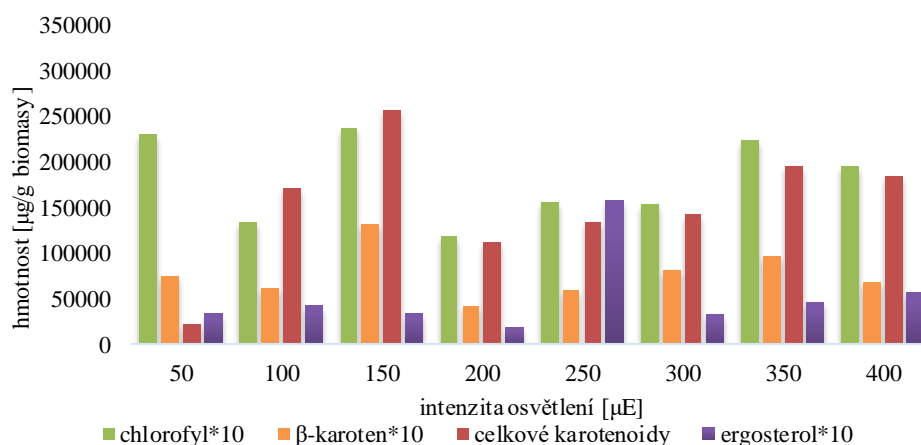


Obrázek 18 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u autotrofních kultur řasy *Chlorella* v BBM médiu

Z grafu (Obrázek 18) je patrné, že nejvyšší produkce všech vybraných metabolitů dosahovala *Chlorella* v BBM médiu při nejnižším osvětlení. S narůstajícím osvětlením dochází k významnému poklesu produkce karotenoidů i chlorofylu. Největší výnos ergosterolu byl zaznamenán u kultur při osvětlení 50 μ E a 200 μ E. U kultur při osvětlení 200 μ E a 250 μ E bylo zjištěno, že vzorek obsahoval o něco více červeného pigmentu β -karotenu (37 mg/g) než zeleného chlorofylu (36 mg/g).

Na grafu z Obrázek 19 jsou uvedeny výsledné koncentrace analyzovaných metabolitů u autotrofní kultivace kmene *Chlorella* v BG11 médiu. V porovnání s kulturami na BBM médiu jsou výnosy karotenoidů menší. U všech vzorků je chlorofyl vždy oproti β -karotenu v majoritním zastoupení a jeho koncentrace je přibližně o polovinu vyšší. Při kulturách na BG11 médiu docházelo k značnému zvýšení produkce ergosterolu. Jeho koncentrace byla u některých vzorků více než třikrát větší než při kulturách na BBM médiu.

Chlorella – autotrofní kultivace - BG11

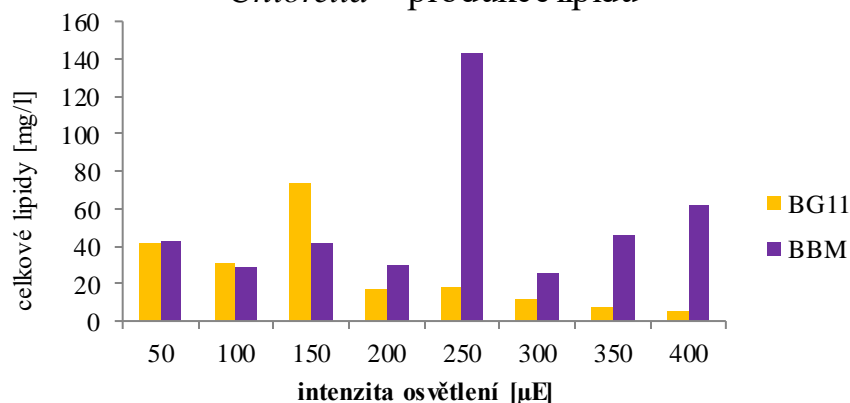


Obrázek 19 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u autotrofních kultivací kmene *Chlorella* v BG11 médiu

5.1.1.4 Produkce lipidů

Pro analýzu lipidů byly chloroformové extrakty upraveny pomocí bazicky katalyzované transesterifikace na methylestery mastných kyselin a následně proměřeny na plynovém chromatografu s FID detekcí postupem uvedeným v kapitole 4.5.5. Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu určení mastných kyselin byly použity příslušné standardy mastných kyselin a z nich sestavena kalibrační závislost.

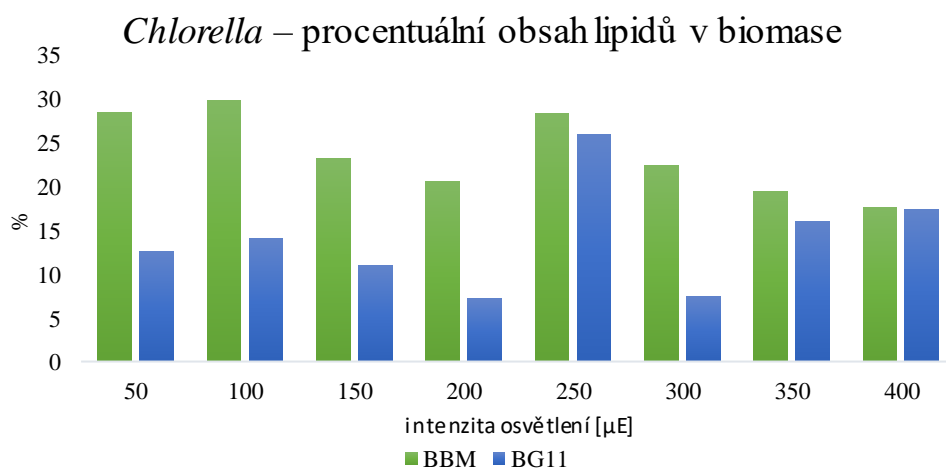
Chlorella – produkce lipidů



Obrázek 20 Produkce celkových lipidů u autotrofních kultivací

Na grafu (Obrázek 20) je přehledně uvedena produkce lipidů u autotrofních kultivací kmene *Chlorella*. K vyšší produkci lipidů u nižších hodnot osvětlení docházelo převážně u kultivací v BG11 médiu. Při zvyšování osvětlení se zvyšovala koncentrace lipidů v BBM médiu a výrazně přesáhla hodnoty u kultivací na BG11 médiu. Nejvyšší koncentrace jednoznačně dosáhl vzorek v BBM médiu při osvětlení 250 μE, jehož hodnota činila 287 mg/l kultury.

Na grafu (Obrázek 21) je uveden procentuální obsah lipidů v biomase. Z grafu je patrné, že obecně docházelo k větší akumulaci lipidických látek u kultivací na BBM médiu, kde lipidy tvořily někdy až více jak 29 % biomasy. V případě BG11 média byla produkce biomasy průměrně třikrát menší než v BBM médiu. Maximální produkce v tomto médiu dosahovala přibližně 25 % hmotnosti biomasy.



Obrázek 21 Procentuální obsah lipidů v biomase u autotrofních kultivací kmene *Chlorella*

Tabulka 3 Procentuální zastoupení mastných kyselin u autotrofních kultivací *Chlorella* v BBM médiu

BBM médium								
kyselina [%]	50 µE	100 µE	150 µE	200 µE	250 µE	300 µE	350 µE	400 µE
undekanová	3,7	4,1	4,2	3,3	0,7	3,0	2,7	1,4
tridekanová	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
myristová	4,6	2,8	4,0	2,2	2,3	1,9	3,3	2,3
pentadekanová	1,4	3,4	1,8	2,4	0,8	1,6	1,2	0,6
palmitová	26,2	26,2	27,8	28,2	26,3	27,8	29,8	23,5
palmitoolejová	2,7	3,9	4,1	4,5	2,9	3,0	5,9	2,6
heptadekanová	0,0	0,0	0,0	3,0	0,9	2,2	3,1	1,9
cis-10-heptadekanová	10,1	2,1	3,8	4,3	0,7	3,8	2,3	2,5
stearová	10,9	16,1	18,2	16,2	14,6	15,2	18,7	11,6
elaidová	11,4	16,6	16,6	15,2	18,4	13,6	17,5	16,3
olejová	17,7	18,2	13,6	9,9	29,4	14,4	9,9	29,8
linolová	10,1	6,6	5,7	11,0	2,9	13,5	5,7	7,5

Tabulka 4 Procentuální zastoupení mastných kyselin u autotrofních kultivací kmene *Chlorella* v BG11 médiu

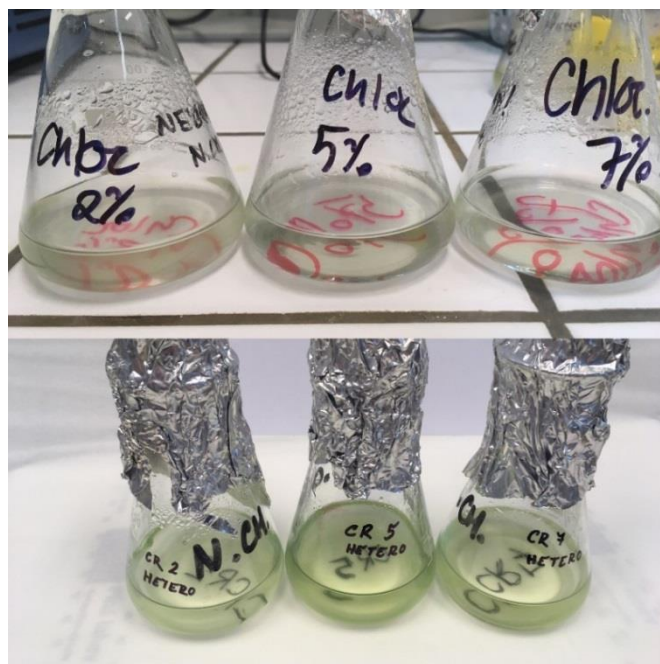
BG11 médium								
kyselina [%]	50 μ E	100 μ E	150 μ E	200 μ E	250 μ E	300 μ E	350 μ E	400 μ E
undekanová	1,2	1,2	0,8	4,4	5,1	4,4	2,1	3,0
myristová	1,8	1,5	2,1	4,7	4,8	2,8	2,6	4,2
pentadekanová	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0
palmitová	24,9	31,6	25,1	28,0	24,4	23,3	22,1	28,0
palmitoolejová	4,0	0,0	3,3	3,6	3,8	4,4	2,9	3,4
heptadekanová	3,1	0,0	0,0	4,6	6,4	3,6	2,1	4,3
cis-10-heptadekanová	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
stearová	14,7	17,1	14,5	17,2	9,7	20,0	12,6	21,4
elaidová	20,8	21,3	19,3	16,1	16,2	15,8	18,7	18,5
olejová	22,1	22,0	31,8	16,5	23,6	16,2	30,2	12,6
linolová	5,4	5,3	2,4	4,9	5,9	9,6	4,9	4,4

Na výše uvedených tabulkách (Tabulka 3 a Tabulka 4) je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v každém vzorku. U kultivací na BBM médiu je nejvíce zastoupena kyselina palmitová, často používaná k výrobě kosmetických produktů, jejíž produkce se pohybuje od 23,5 % do 28,9 %. Další hojně zastoupenou kyselinou je kyselina stearová, jejíž hodnoty jsou nejmenší u nejvyššího a nejnižšího osvětlení. Kyselina tridekanová byla detekována v nízkém zastoupení jen u jednoho vzorku a její výskyt je u tohoto kmene ojedinělý. Zajímavý je i obsah kyseliny olejové, který se pohybuje v rozpětí od 9,9 % až do 29,8 %. K produkci kyseliny heptadekanové docházelo až při vyšších osvětleních, její obsah byl ale nízký.

U kultivací na BG11 médiu docházelo k větší produkci kyseliny elaidové a naopak ke snížení produkce kyseliny linolové. Kyselina cis-10-heptadekanová se u kultivací na BG11 médiu objevila jen u prvního vzorku s nejnižším osvětlením, naopak u kultivací na BBM byla obsažena vždy, a to i v 10% zastoupení.

5.1.2 Heterotrofní kultivace

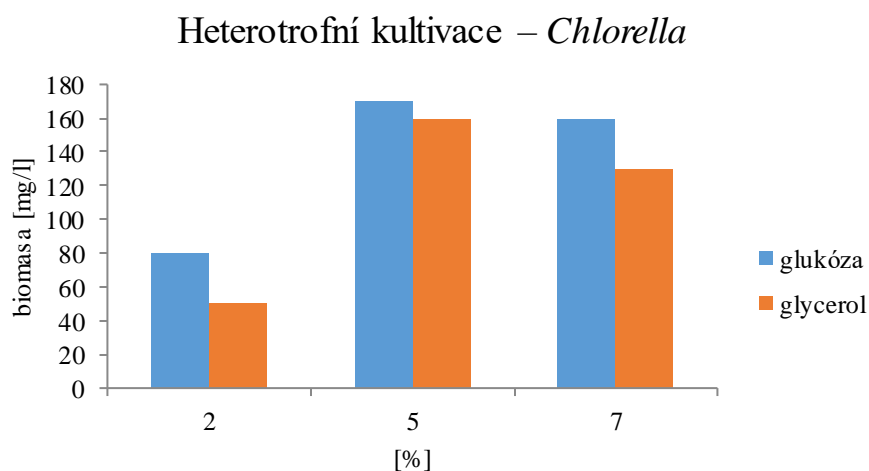
Pro heterotrofní kultivace bylo použito BBM médium s přidavkem organického zdroje uhlíku, a to glukózy nebo glycerolu tak, aby byl vytvořen 2%, 5% a 7% roztok těchto látek. Během kultivace bylo zcela zamezeno přístupu jakéhokoli světla. Celkem tedy bylo provedeno 6 kultivací, které trvaly vždy 168 hodin. Během této doby byl proveden odběr vzorů v 96. hodině. Na grafu (Obrázek 22) je fotografie kultury *Chlorella* po celé heterotrofní kultivaci. V horní polovině obrázku jsou kultivace prováděny na médiu s přidavkem glukózy v pořadí 2, 5 a 7%. V dolní části jsou zachyceny kultivace na glycerolovém médiu s koncentracemi ve stejném pořadí.



Obrázek 22 Výsledný vzhled heterotrofních kultur *Chlorella* (nahore glukózové médium, dole glycerolové médium)

5.1.2.1 Celková biomasa

Ke stanovení celkové biomasy u heterotrofních kultivací byl odebrán vzorek na konci kultivace a gravimetricky stanovena hmotnost (viz kapitola 4.5.1). Z níže uvedeného grafu (Obrázek 23) je patrné, že k větší produkci biomasy docházelo u kultivací na médiu s přidavkem glukózy, rozdíl není ale tak značný a vždy se liší maximálně jen o 30 mg/l kultury. Nejvyšší výnos biomasy byl zaznamenán u kultivace na médiu s 5% obsahem glukózy, jehož hodnota byla 170 mg/l kultury.

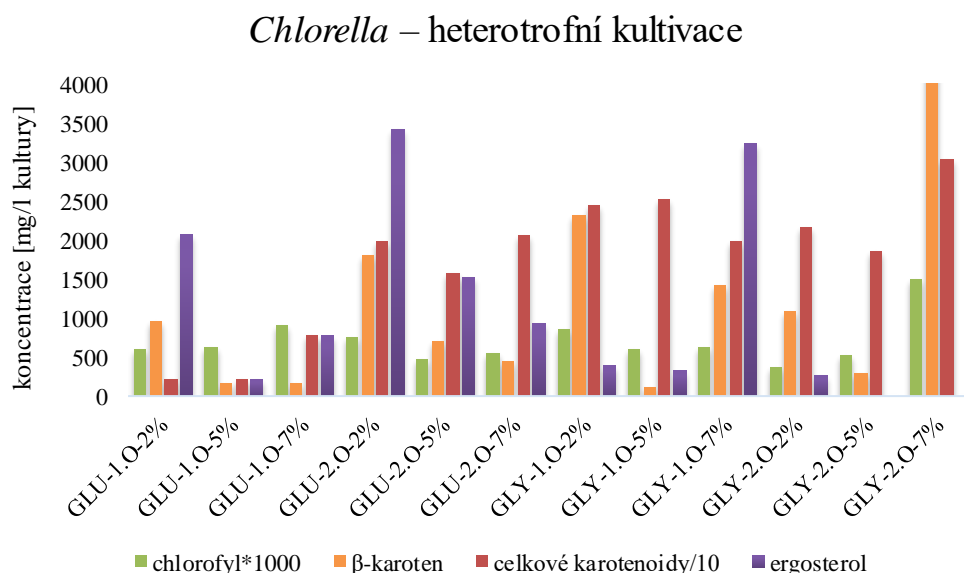


Obrázek 23 Celková biomasa u heterotrofních kultivací *Chlorell*y

5.1.2.2 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Stejně jako u předchozích kultivací tak i zde byla analyzována produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu pomocí metody HPLC/PDA (viz kapitola 4.5.3). Z prvního odběru po 96 hodinách kultivace a druhého odběru na konci kultivace je vidět chování řasy a produkce vybraných metabolitů v závislosti na složení kultivačního média.

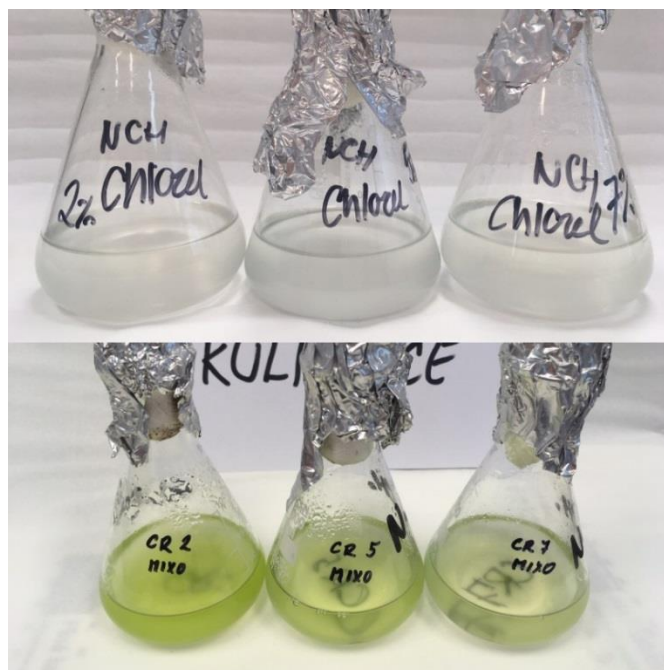
Na Obrázek 24 je graf, který shrnuje produkci těchto metabolitů u heterotrofních kultivací. U médií s přidavkem glukózy byla zaznamenána nižší produkce chlorofylu než u médií s glycerolem. Největší koncentrace chlorofylu 1,5 mg/l byla naměřena na konci kultivace v BBM médiu se 7% obsahem glycerolu. Během těchto kultivací docházelo k výrazné produkci ergosterolu čísla, jehož obsah v mnohých případech převyšoval chlorofyl a β -karoten. Zajímavé je, že během kultivací na glycerolových médiích docházelo až k úplnému vymizení ergosterolu ve vzorcích. Co se týče produkce karotenoidů a β -karotenu, největší koncentrace těchto látek byla zaznamenána při kultivaci na médiu s přidavkem 7 % glycerolu. U této kultivace byla koncentrace ergosterolu zřejmě velmi nízká, proto se ho nepodařilo detekovat.



Obrázek 24 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u heterotrofních kultivací *Chlorella*

5.1.3 Mixotrofní kultivace

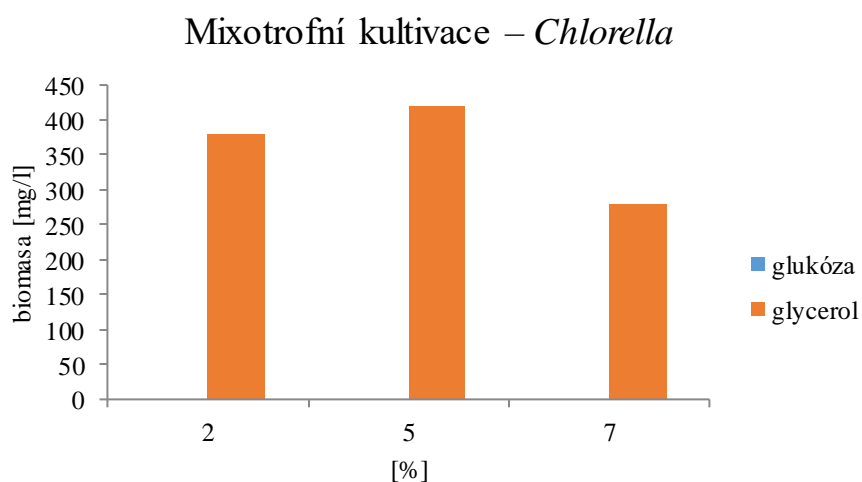
Mixotrofní kultivace *Chlorella* byly provedeny na BBM médiu s přidavkem glukózy a glycerolu v koncentracích 2, 5 a 7 % těchto látek. Kultury byly kultivovány za neustálého osvětlení taktéž po dobu 168 hodin s jedním odběrem (po 96 hodinách) během kultivace. Bylo zjištěno, že *Chlorella vulgaris* není schopna žádného růstu na BBM médiích s přidavkem glukózy při mixotrofním způsobu kultivace. Na fotografii (Obrázek 25) je zdokumentován výsledný vzhled těchto kultur.



Obrázek 25 Výsledný vzhled mixotrofních kultivací řasy *Chlorella* (nahore glukózové médium, dole glycerolové médium)

5.1.3.1 Celková biomasa

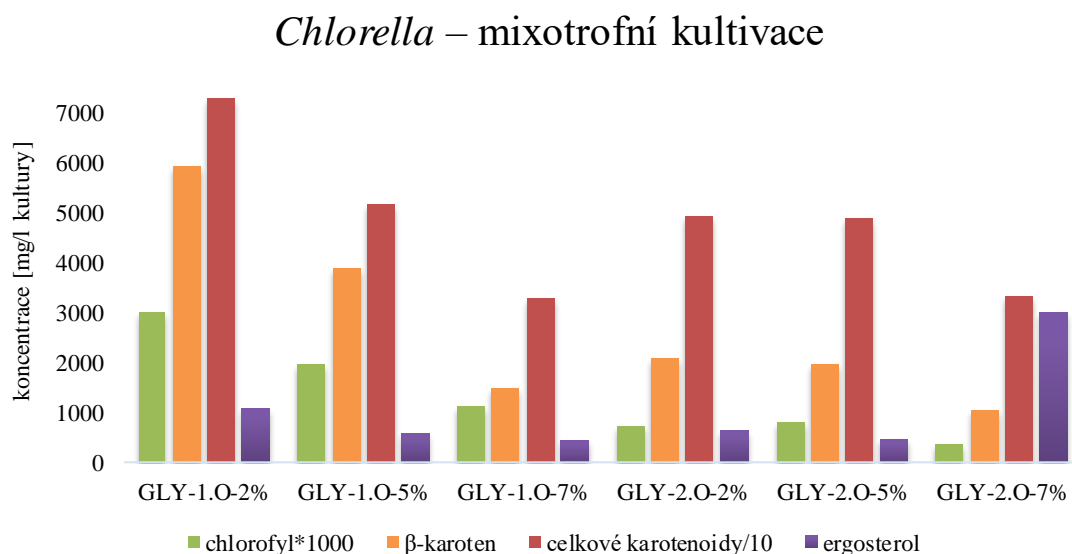
Gravimetricky stanovená biomasa mixotrofních kultivací *Chlorella* je uvedena v grafu (Obrázek 26). Jak už bylo zmíněno, nebylo možné stanovit biomasu u kultivací na glukózových médiích. Řasa nejvíce narostla na médiu s 5% přídavkem glycerolu, kde její biomasa byla 420 mg/l, což je více jak dvojnásobný nárůst než u heterotrofních kultivací.



Obrázek 26 Celková biomasa u mixotrofních kultivací kmene *Chlorella*

5.1.3.2 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Vzorky byly analyzovány metodou HPLC/PDA a byla stanovena koncentrace příslušných metabolitů, jejichž hodnoty jsou uvedeny v grafu (Obrázek 27). Z těchto údajů vyplývá, že nejvyšší produkce pigmentů bylo dosaženo u vzorku z kultivace na médiu s 2% obsahem glycerolu při prvním odběru. Na konci kultivace došlo k výraznému poklesu všech sledovaných látek. Na konci kultivace *Chlorella* na médiu s 7% glycerolu byl stanoven výrazně vyšší obsah ergosterolu, než který vykazovaly ostatní vzorky. *Chlorella* nebyla schopna žádného růstu na glukózových médiích, proto z těchto kultivací chybí data.



Obrázek 27 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u mixotrofních kultivací *Chlorella*

5.1.4 Zhodnocení kultivací *Chlorella vulgaris*

Z předešlých uvedených dat lze konstatovat, že největší nárůst biomasy u *Chlorella* byl zjištěn u autotrofních kultivací na BBM médiu při osvětlení 200 μ E, kde hmotnost biomasy byla 415 mg/l kultury. Další stejně výnosná kultivace z pohledu biomasy byla při mixotrofním způsobu na BBM médiu s obsahem 5% glycerolu.

5.2 Výsledky kultivací řasy *Chlamydomonas reinhardtii*

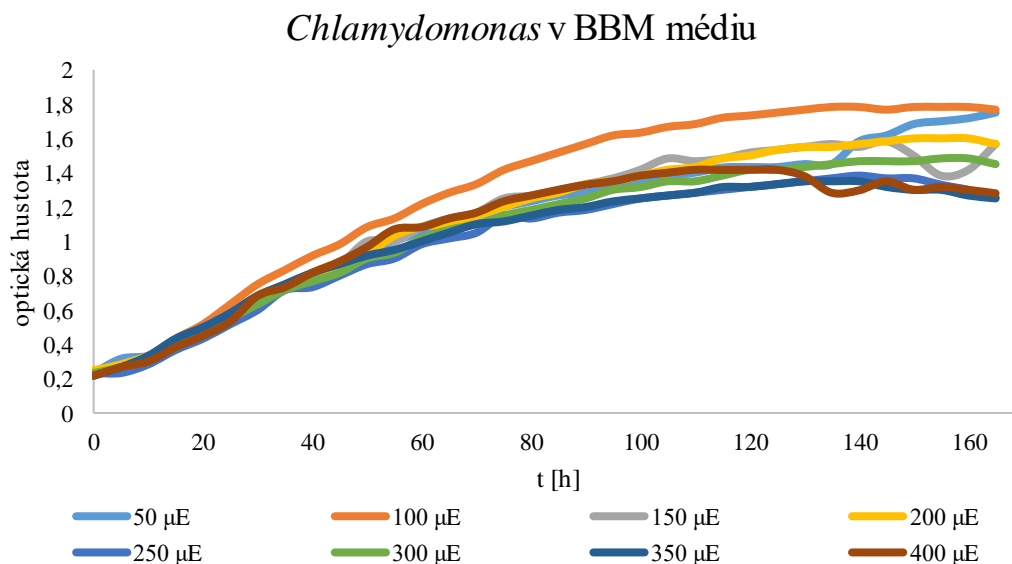
U řasy *Chlamydomonas reinhardtii* bylo vyzkoušeno také 28 různých kultivací, 16 z nich bylo kultivováno autotrofně, 6 kultivací proběhlo heterotrofním způsobem a 6 způsobem mixotrofním. Pro heterotrofní a mixotrofní kultivace bylo vybráno BBM médium taktéž s přidávkou dvou různých zdrojů uhlíku (glukóza a glycerol) při třech různých koncentracích. Bylo zjištěno, že *Chlamydomonas* nebyla schopna žádného růstu na glycerolových médiích při heterotrofních kultivacích a při kultivacích mixotrofních na glukózových médiích.

5.2.1 Autotrofní kultivace

Autotrofní kultivace probíhaly v multikultivátoru při teplotě 25 °C a za neustálého vzdušnění. Ke každému vzorku bylo nastaveno individuální osvětlení vzestupně od 50 μ E do 400 μ E s krokem 50 μ E.

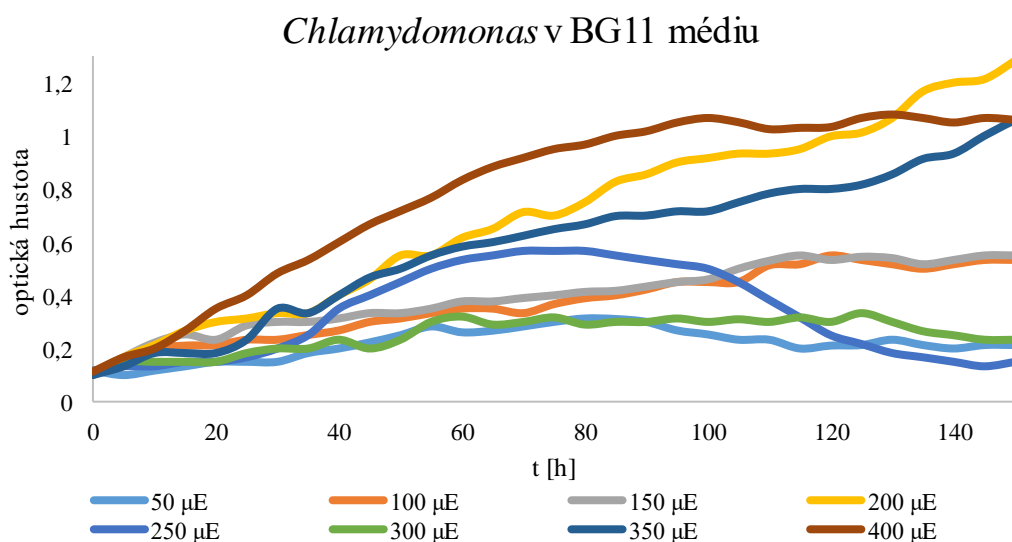
5.2.1.1 Růstové křivky

Během kultivací byla nepřetržitě sledována optická hustota při 680 nm. Z těchto dat byly sestaveny růstové křivky.



Obrázek 28 Růstová křivka – *Chlamydomonas* v BBM médiu

Z grafu (Obrázek 28) vyplývá, že nejvhodnějším osvětlením pro kultivaci *Chlamydomonas* v BBM médiu bylo jednoznačně 50 μE . Nejmenší optické hustoty pak řasa dosáhla při vyšších intenzitách osvětlení, jako je např. 350 μE a 400 μE . Stacionární fáze dosáhly všechny kultury kromě té s osvětlením 250 μE poměrně ve stejné době kolem 150. hodiny kultivace.

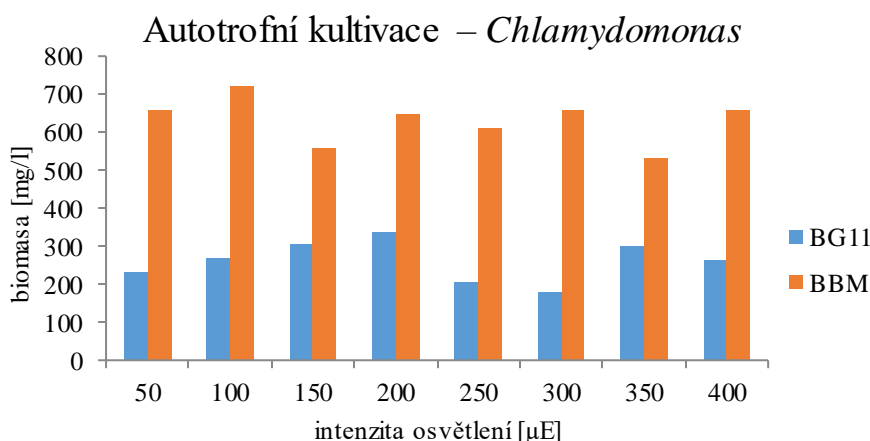


Obrázek 29 Růstová křivka – *Chlamydomonas* v BG11 médiu

Na grafu (Obrázek 29) je růstová křivka *Chlamydomonas* v BG11 médiu. Největší nárůst dle optické hustoty byl pozorován při osvětlení 200 μE , 400 μE a 350 μE . U kultivace s osvětlením 250 μE nastala stacionární fáze výrazně dříve než u ostatních, a to kolem 80. hodiny. Kultivace s osvětlením 50 μE , 250 μE a 300 μE dosáhly nejnižšího nárůstu biomasy dle hodnot optické hustoty.

5.2.1.2 Celková biomasa

Z grafu (Obrázek 30) si lze všimnout, že všechny hodnoty biomasy u kultivací v BBM médiu jsou vyšší než u kultivací v médiu BG11. Největší nárůst biomasy byl zaznamenán u kultivací v BBM médiu při nižších intenzitách osvětlení. Výsledná hmotnost biomasy u kultivací na BG11 médiu byla téměř u všech vzorků minimálně o polovinu menší než na BBM médiu.



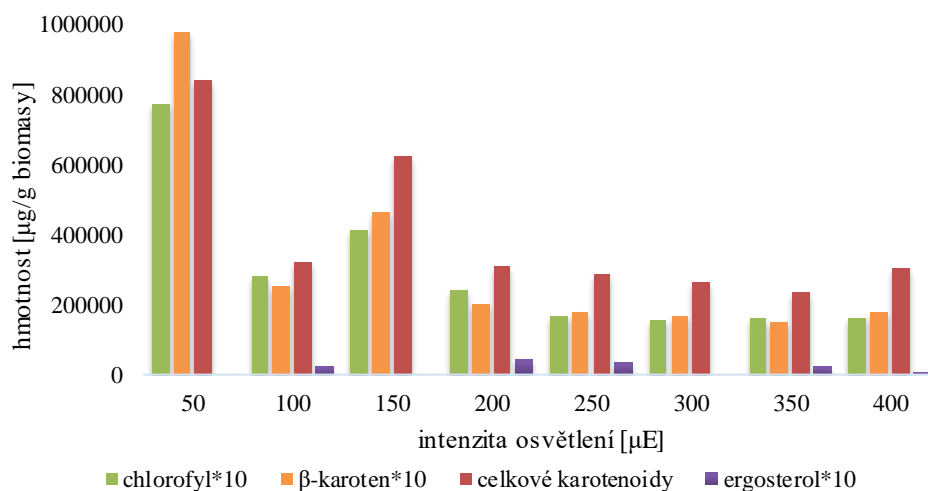
Obrázek 30 Celková biomasa u autotrofních kultivací *Chlamydomonas*

5.2.1.3 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Po ukončení všech kultivací byl odebrán vzorek, který byl vyextrahován, následně analyzován pomocí metody HPLC/PDA (viz kapitola 4.5.3) a byly u něj stanoveny koncentrace celkových karotenoidů, β -karotenu, chlorofylu a ergosterolu. V grafu (Obrázek 31) je znázorněno srovnání produkčních schopností výše uvedených metabolitů u kultivací *Chlamydomonas* na BBM médiu při různých intenzitách osvětlení. Z uvedených dat je patrné, že koncentrace sledovaných látek se se zvyšující intenzitou osvětlení snižuje. Nejvyšší produkce všech pigmentů dosáhla řasa při nejnižším osvětlení 50 μE , nicméně u tohoto vzorku nebyl kvůli nízké koncentraci detekován žádný ergosterol. Je možné si také všimnout, že koncentrace dvou hlavních barviv, chlorofylu a β -karotenu, jsou téměř u všech vzorků vyvážené. Ergosterol byl detekován v nízkých koncentracích pouze jen u některých vzorků, zejména těch se střední hodnotou intenzity osvětlení.

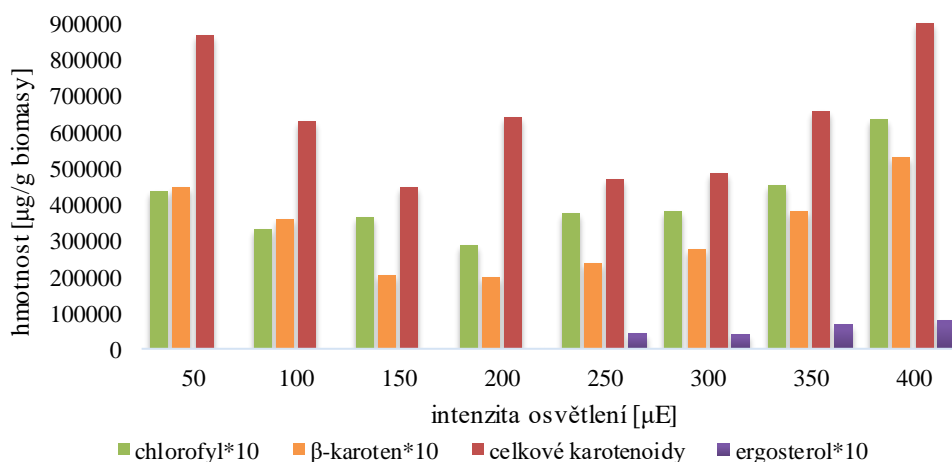
Produkční znaky u kultivací *Chlamydomonas* v BG11 médiu (Obrázek 32) jsou mírně vyšší než u kultivací na BBM. Téměř u všech vzorků došlo k nadprodukcí celkových karotenoidů, β -karotenu i chlorofylu. Největší produkce těchto pigmentů byla zaznamenána u vzorku s nejmenším a největším osvětlením. Nejvyšší koncentrace chlorofylu 63,5 mg/g byla zaznamenána u kultivace s osvětlením 400 μE . U vzorků s vyšším osvětlením počínajícím 250 μE docházelo k produkci ergosterolu, jeho koncentrace byla 4,2 mg/g a postupně zvyšovala.

Chlamydomonas – autotrofní kultivace - BBM



Obrázek 31 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u autotrofních kultivací *Chlamydomonas* v BBM médiu

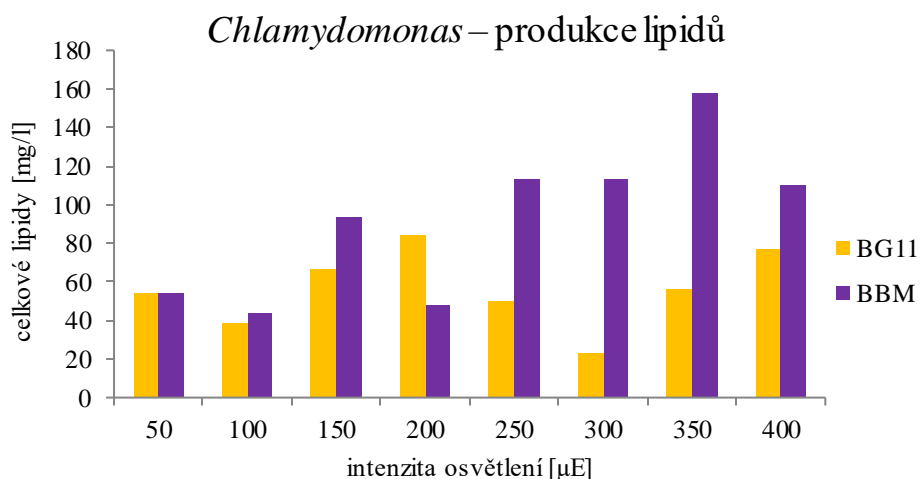
Chlamydomonas – autotrofní kultivace - BG11



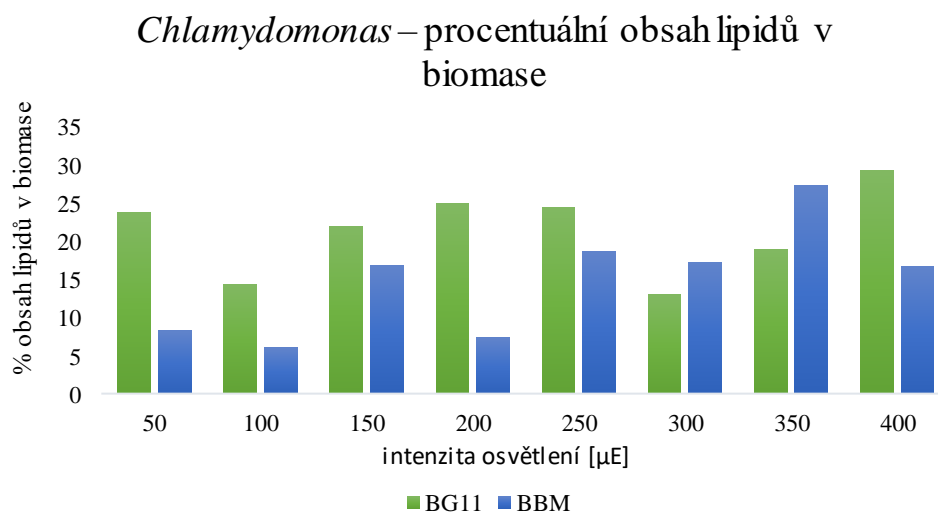
Obrázek 32 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u autotrofních kultivací *Chlamydomonas* v BG11 médiu

5.2.1.4 Produkce lipidů

K analýze lipidů sloužily vyextrahované chloroformové vzorky, které byly transesterifikovány na methylestery mastných kyselin a následně proměřeny na plynovém chromatografu s FID detekcí (viz kapitola 4.5.5). Nejvyšší produkce lipidů bylo jednoznačně dosaženo při kultivaci *Chlamydomonas* na BBM médiu s osvětlením 350 μE , kdy koncentrace lipidů byla 158,2 mg/l kultury. Maximální koncentrace lipidů na BG11 médiu byla pouhých 84,3 mg/l kultury, tudíž k větší tvorbě lipidů docházelo obecně u kultivací na BBM médiu. Kompletní výsledky produkčních schopností lipidických látek jsou znázorněny na grafu (Obrázek 33).



Obrázek 33 Produkce celkových lipidů u autotrofních kultivací *Chlamydomonas*



Obrázek 34 Procentuální obsah lipidů v biomase u autotrofních kultivací *Chlamydomonas*

Procentuální zastoupení lipidů v biomase je shrnuto v grafu (Obrázek 34). K větší akumulaci lipidů docházelo při kultivacích na BG11 médiu, kde se jejich procentuální zastoupení pohybovalo průměrně okolo 25 %. Tento jev úzce souvisí s nižším výnosem biomasy. Přebytková energie k dělení buněk se nespotřebává a uloží ve formě lipidů.

Tabulka 5 Procentuální zastoupení mastných kyselin u autotrofních kultivací kmene *Chlamydomonas* v BBM médiu

BBM médium								
kyselina [%]	50 µE	100 µE	150 µE	200 µE	250 µE	300 µE	350 µE	400 µE
kaprylová	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
undekanová	1,3	3,7	1,1	2,0	0,5	2,8	0,7	2,3
tridekanová	2,5	1,4	1,4	0,8	0,7	0,8	0,4	1,0
myristová	2,7	1,8	2,8	2,3	1,7	2,4	3,0	4,8
pentadekanová	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	0,9	0,6
palmitová	34,4	29,6	30,9	27,9	24,7	30,0	25,4	30,3
palmitoolejová	4,0	3,6	2,9	0,0	1,5	4,3	2,7	2,4
heptadekanová	2,1	0,0	1,8	2,0	1,0	1,7	0,9	1,7
cis-10-heptadekanová	0,0	0,0	0,0	2,6	0,7	0,8	0,0	1,5
stearová	15,7	13,5	19,0	15,5	10,6	16,6	20,8	9,9
elaidová	18,1	11,8	15,5	11,0	15,6	16,0	26,8	12,1
olejová	2,0	19,2	15,7	19,6	34,2	18,5	4,5	23,9
linolová	17,4	14,3	9,1	16,3	8,1	5,5	4,9	9,4
γ-linolenová	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
linolenová	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,2	0,0

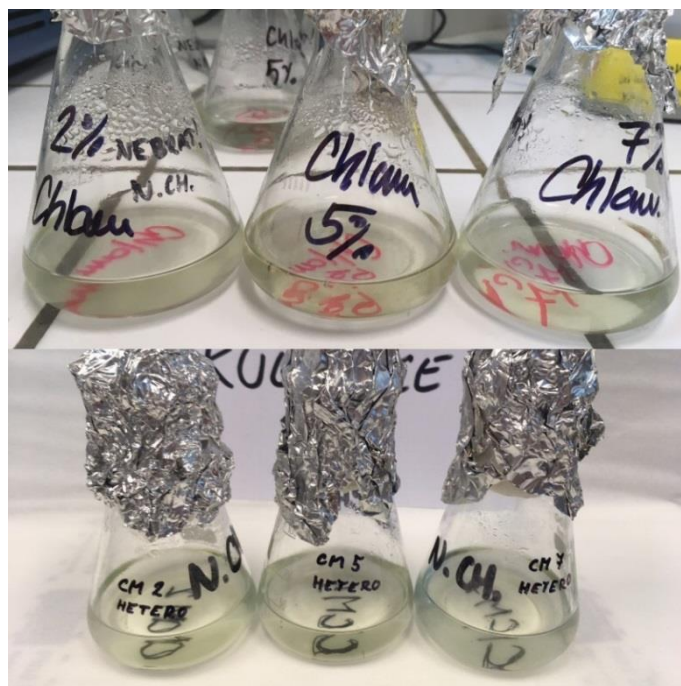
Tabulka 6 Procentuální zastoupení mastných kyselin u autotrofních kultivací kmene *Chlamydomonas* v BG11 médiu

BG11 médium								
kyselina [%]	50 µE	100 µE	150 µE	200 µE	250 µE	300 µE	350 µE	400 µE
kaprylová	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0
undekanová	3,1	1,7	0,0	0,0	3,2	9,9	2,1	4,1
tridekanová	1,5	1,3	1,4	0,0	1,6	8,0	1,2	1,7
myristová	3,9	2,3	2,8	4,9	6,4	0,0	2,0	4,5
pentadekanová	0,0	0,0	0,0	2,5	1,0	0,0	0,0	1,0
palmitová	28,2	30,2	22,8	5,3	31,7	31,8	24,7	27,6
palmitoolejová	2,2	3,2	2,1	5,1	3,8	0,0	1,2	2,6
heptadekanová	2,4	2,6	0,0	4,6	2,8	0,0	8,2	2,7
stearová	20,3	27,9	13,5	34,7	11,9	23,8	11,0	18,4
elaidová	18,7	17,1	16,7	27,5	20,1	22,7	15,4	14,5
olejová	12,1	2,0	29,7	0,0	8,6	3,8	15,6	12,8
linolová	7,6	11,6	11,0	1,2	8,8	0,0	17,0	10,1
γ-linolenová	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
linolenová	0,0	0,0	0,0	14,1	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabulky (Tabulka 5 a Tabulka 6) sumarizují procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve všech vzorcích při autotrofních kultivacích *Chlamydomonas*. V této řase jsou majoritně zastoupeny kyseliny palmitová, stearová, elaidová a linolová. Další hojně zastoupenou kyselinou některých vzorků je kyselina olejová, její procentuální zastoupení je nejvyšší u kultivací na BBM médiu při středních hodnotách intenzity světla. Kyselina cis-10-heptadekanová je jedinou kyselinou, která se objevila jen u kultivací na BBM médiu při vyšších intenzitách osvětlení. Ojediněle se v řase *Chlamydomonas* vyskytují kyseliny kaprylová, pentadekanová, γ -linolenová a linolenová.

5.2.2 Heterotrofní kultivace

K heterotrofním kultivacím bylo použito BBM médium obohacené o organický zdroj uhlíku a to glukózu a glycerol. Tyto látky byly přidány ve třech různých množstvích tak, aby tvořily 2, 5 a 7% roztoky. Řasa *Chlamydomonas reinhardtii* nebyla při těchto kultivacích schopna růstu na médiích s přidavkem glycerolu, její optická hustota na konci kultivace byla výrazně nižší než při naočkování kultury. Na fotografii (Obrázek 35) je zdokumentován výsledný vzhled všech heterotrofních kultur.

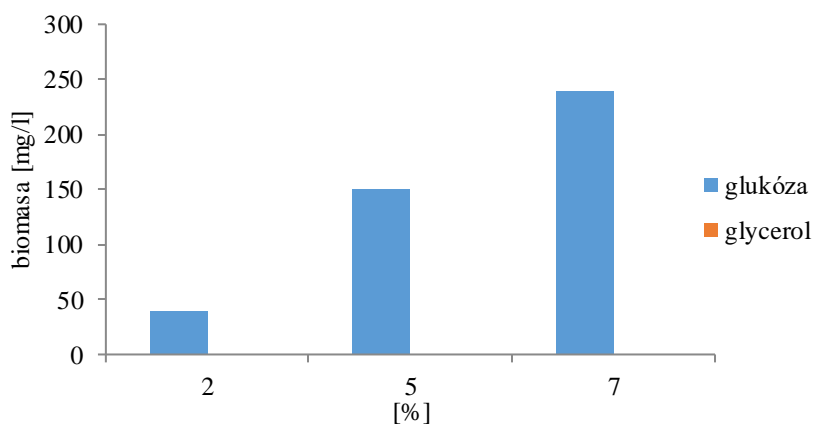


Obrázek 35 Výsledný vzhled heterotrofních kultivací *Chlamydomonas* (nahore glukózové médium, dole glycerolové médium)

5.2.2.1 Celková biomasa

Celková biomasa u heterotrofních kultivací *Chlamydomonas* nedosahovala příliš vysokých výtěžků. Tyto hodnoty shrnuje graf (Obrázek 36). Na glycerolových médiích byl nárůst biomasy nulový, z tohoto důvodu data chybí.

Heterotrofní kultivace – *Chlamydomonas*

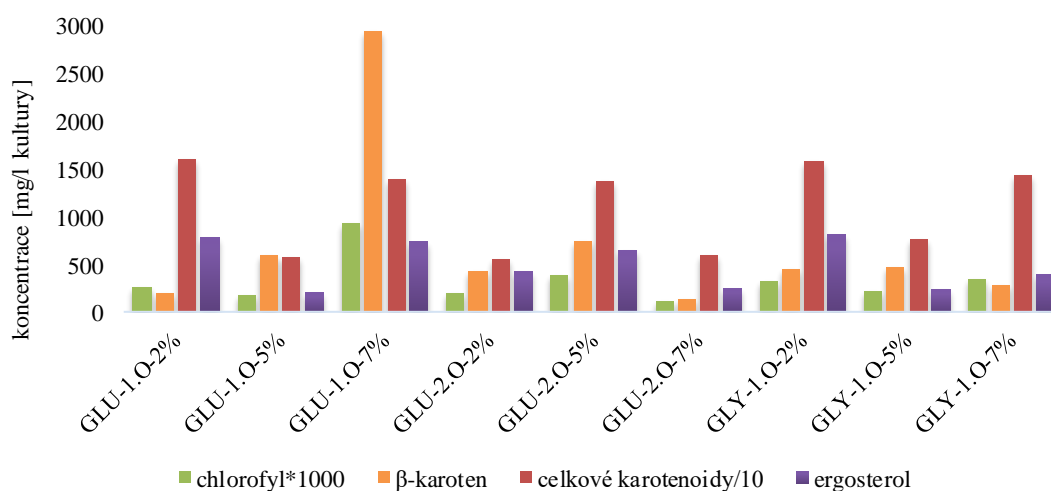


Obrázek 36 Celková biomasa u heterotrofních kultivací *Chlamydomonas*

5.2.2.2 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Ke sledování produkce pigmentů a ergosterolu byl z každé kultivace odebrán vzorek během kultivace v 96. hodině a na konci kultivace po 168 hodinách. Obecně docházelo k velmi nízké produkci chlorofylu, nejvíce 0,92 mg/l. Naproti tomu ergosterol, který se u autotrofních kultivací vyskytoval jen ojediněle, byl zastoupen u heterotrofních kultivací ve všech vzorcích a významně převažoval nad chlorofylem, jeho nejvyšší koncentrace byla 808,9 mg/l. Největší koncentrace všech stanovovaných metabolitů byla zaznamenána u kultivace na BBM médiu se 7% obsahem glukózy v 96. hodině kultivace. Kultivace řasy na glycerolových médiích měla letální následky, z tohoto důvodu data u druhého odběru chybí.

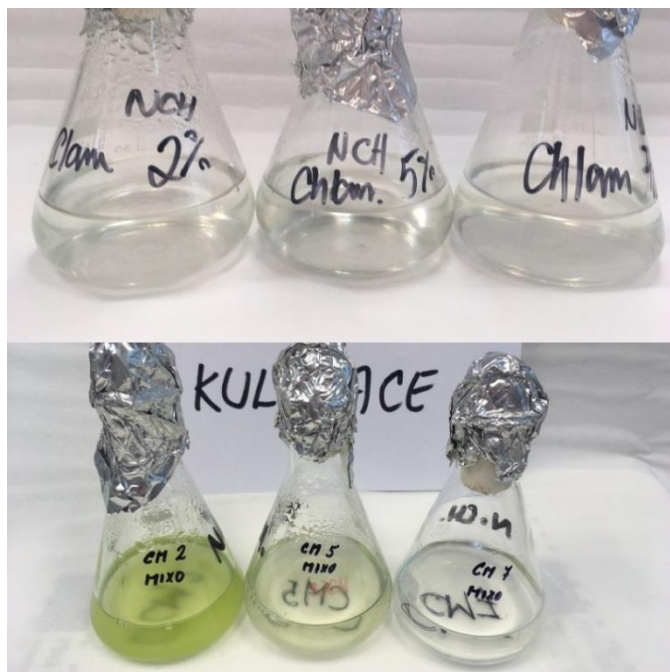
Chlamydomonas – heterotrofní kultivace



Obrázek 37 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u heterotrofních kultivací *Chlamydomonas*

5.2.3 Mixotrofní kultivace

Mixotrofními kultivacemi bylo zjištěno, že řasa *Chlamydomonas reinhardtii* není schopna růstu tímto způsobem. Přežít byla řasa schopna jen na BBM médiu s přidavkem 2% glycerolu. Níže (Obrázek 38) jsou uvedeny fotografie výsledků mixotrofních kultivací.



Obrázek 38 Výsledný vzhled mixotrofních kultivací *Chlamydomonas* (nahore glukózové medium, dole glycerolové médium)

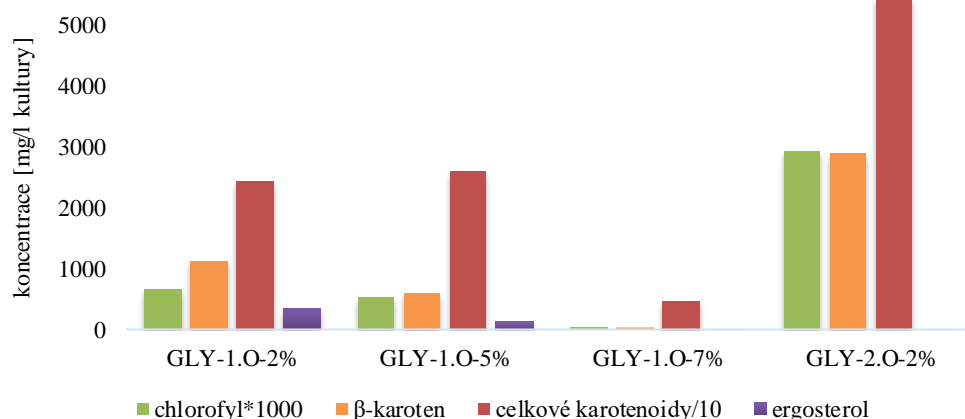
5.2.3.1 Celková biomasa

Gravimetricky byla stanovena biomasa u jednoho vzorku kultivovaném na BBM médiu s 2% glycerolu, její hmotnost činila 300 mg/l kultury, což je větší nárůst než u heterotrofních kultivací. Ostatní vzorky kultivované tímto způsobem nebyly schopné růstu, proto nebyly naměřeny žádné data.

5.2.3.2 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Po analýze vzorku z kultivace na BBM médiu s 2% glycerolu bylo zjištěno, že v druhé polovině kultivace došlo k výraznému nárůstu všech pigmentů, zejména chlorofylu, na úkor produkce ergosterolu, který na konci této kultivace nebyl detekován. Mixotrofní způsob kultivace této řasy měl u většiny médií letální následky, proto chybí v grafech data z měření produkovaných karotenoidů, β -karotenu, chlorofylu a ergosterolu.

Chlamydomonas – mixotrofní kultivace



Obrázek 39 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u mixotrofních kultivací *Chlamydomonas*

5.2.4 Celkové zhodnocení kultivací *Chlamydomonas reinhardtii*

Ze všech provedených kultivací bylo zjištěno, že největší produkce biomasy a lipidů je při autotrofních kultivacích na BBM médiu. Heterotrofní a mixotrofní způsoby kultivace nejsou k produkci biomasy pro tento kmen vhodné. Heterotrofně byla *Chlamydomonas* schopná produkce ergosterolu na úkor snížení produkce chlorofylu a β-karotenu.

5.3 Výsledky kultivací řasy *Desmodesmus acutus*

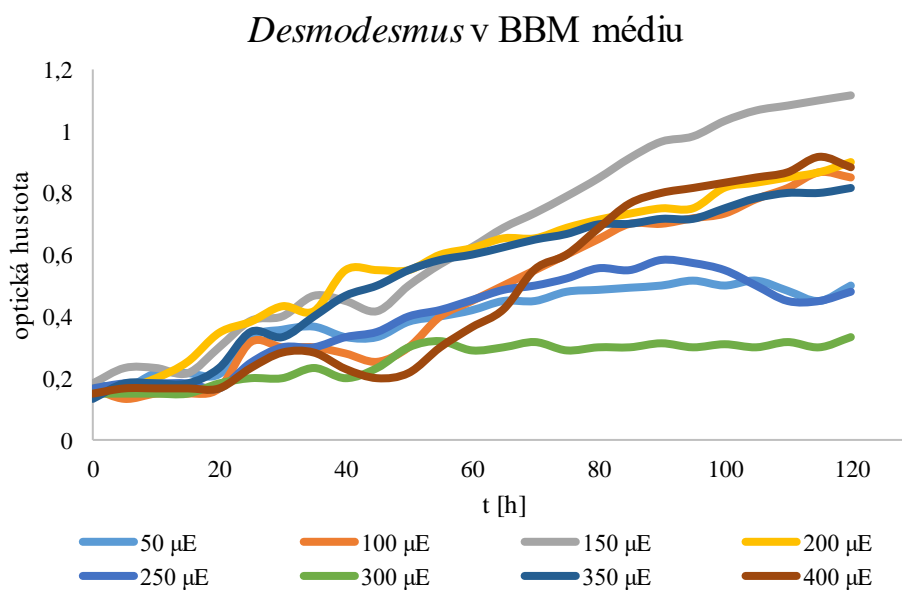
Řasa *Desmodesmus acutus* byla také kultivována celkem 28 různými způsoby, z toho 16 bylo provedeno autotrofně, 6 heterotrofním způsobem a 6 mixotrofně. Pro heterotrofní a mixotrofní kultivace bylo použito BG11 médium s přidavkem glukózy a glycerolu, tak aby vznikl 2, 5 a 7% roztok. Z výsledků bylo zjištěno, že řasa *Desmodesmus acutus* je schopná růstu na všech médiích, které byly vyzkoušeny.

5.3.1 Autotrofní kultivace

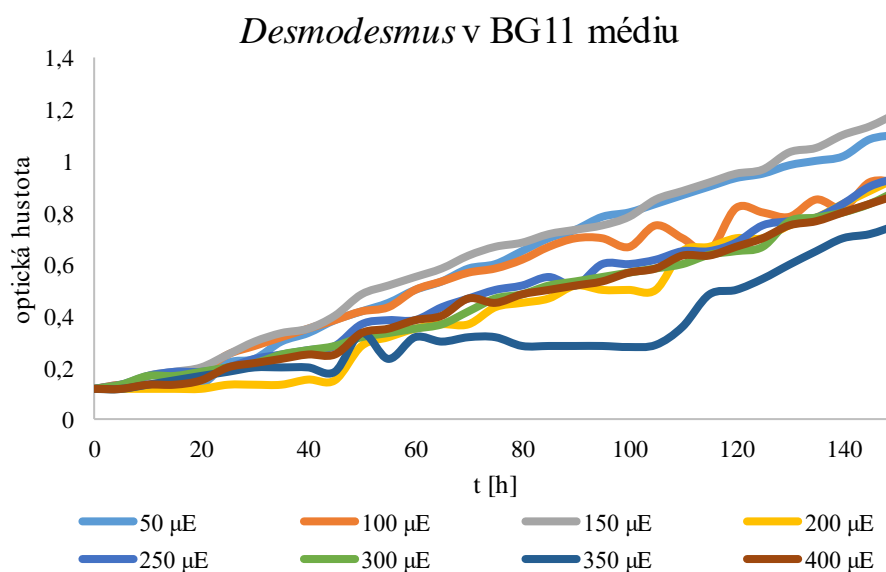
Desmodesmus acutus byl autotrofně kultivován v multikultivátoru s vytemperovanou vodní lázní na 25 °C za neustálého vzdušnění. Intenzita osvětlení byla nastavena vzestupně od 50 μE do 400 μE s krokem 50 μE jako u předchozích autotrofních kultivací.

5.3.1.1 Růstové křivky

Během kultivací byla kontinuálně sledována optická hustota při 680 nm u jednotlivých vzorků a z těchto hodnot pak byly sestaveny růstové křivky. Z grafu (Obrázek 40) je patrné, že největšího nárůstu optické hustoty dosahuje *Desmodesmus* v BBM médiu při osvětlení 150 μE. Nejnižší optická hustota byla naměřena u vzorku s osvětlením 300 μE. Tento vzorek se ani během kultivace nedostal do výrazné exponenciální fáze a jeho optická hustota se pohybovala kolem hodnoty 0,2. Na grafu (Obrázek 41) s růstovou křivkou řasy *Desmodesmus* v BG11 médiu lze vidět, že růst probíhal u všech vzorků obdobně a stacionární fáze dosáhly ve stejné době.



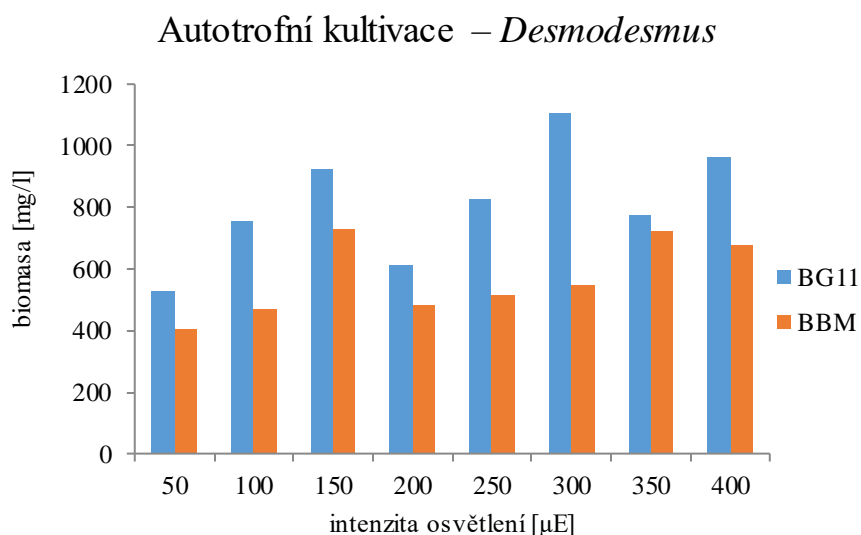
Obrázek 40 Růstová křivka – *Desmodesmus* v BBM médiu



Obrázek 41 Růstová křivka – *Desmodesmus* v BG11 médiu

5.3.1.2 Celková biomasa

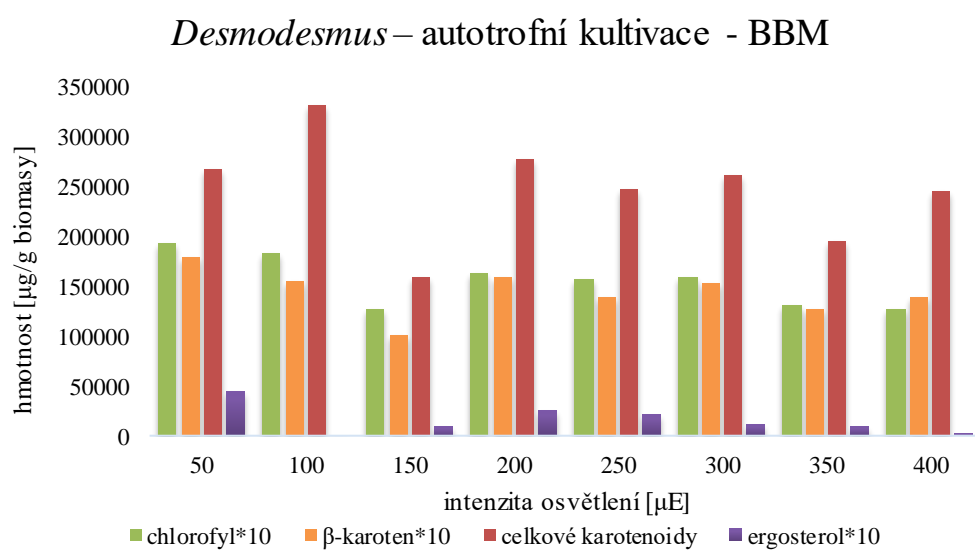
Celková biomasa byla stanovena gravimetricky (viz kapitola 4.5.1) a z grafu (Obrázek 42) je patrné, že kultivace v BG11 médiu byla u každého osvětlení vždy výhodnější, co se týče nárůstu biomasy. Jako nejvhodnější hodnota intenzity osvětlení se ukázala 300 µE a 400 µE. Při nižších hodnotách osvětlení docházelo k poklesu tvorby biomasy.



Obrázek 42 Celková biomasa u autotrofních kultivací *Desmodesmus*

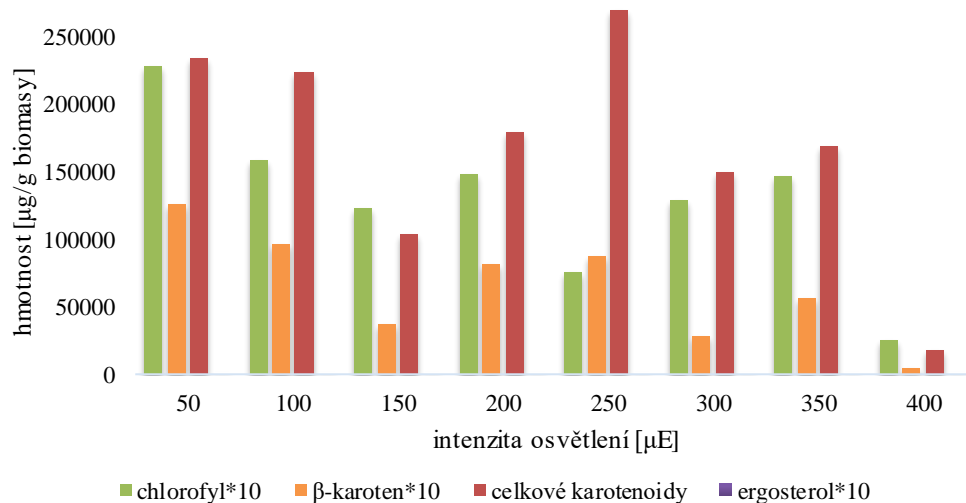
5.3.1.3 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Po extrakci byly vzorky proměřeny na kapalinovém chromatografu s PDA detekcí a byly stanoveny již známé metabolity.



Obrázek 43 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u autotrofních kultivací *Desmodesmus* v BBM médiu

Desmodesmus – autotrofní kultivace - BG11

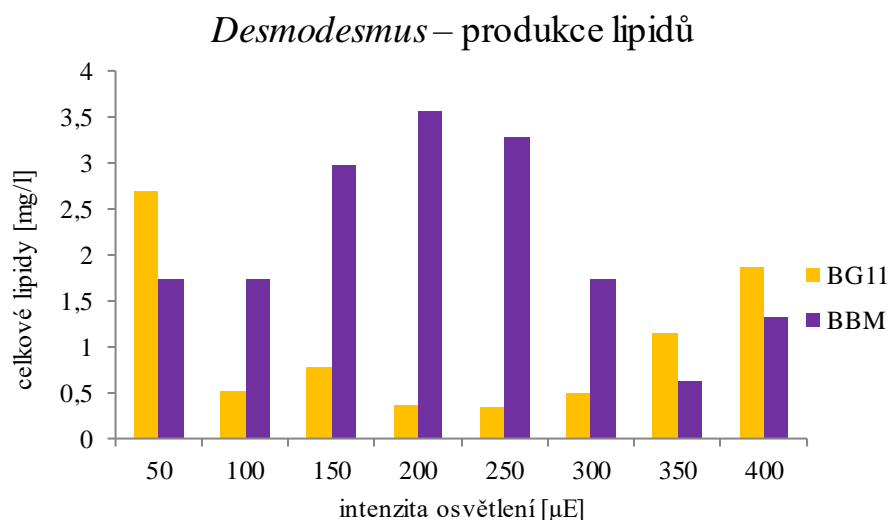


Obrázek 44 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u autotrofních kultivací *Desmodesmus* v BG11 médiu

Výsledné koncentrace všech stanovovaných látek jsou uvedeny v grafech (Obrázek 43 a Obrázek 44). Produkce celkových karotenoidů při kultivaci *Desmodesmus* na BBM médiu byla značně vyšší od 159 mg/g do 330 mg/g než v případě kultivací v BG11 médiu. Nejvyšší koncentrace karotenoidy dosáhly u kultivace s intenzitou osvětlení 100 µE u BBM média, kde koncentrace byla 330 mg/g. Chlorofyl byl výrazně víc produkován řasami kultivovanými v BG11 médiu, a to na úkor tvorby β-karotenu. Nejvyšší koncentrace dosahoval při kultivaci na BG11 s nejnižším osvětlením, konkrétně u osvětlení 50 µE, kde koncentrace byla 22,9 mg/g. U kultivací na BBM byly koncentrace těchto dvou látek poměrně vyvážené. K tvorbě ergosterolu docházelo pouze u kultivací na BBM médiu a to pouze v nízkých koncentracích od 4,4 mg/g a níže.

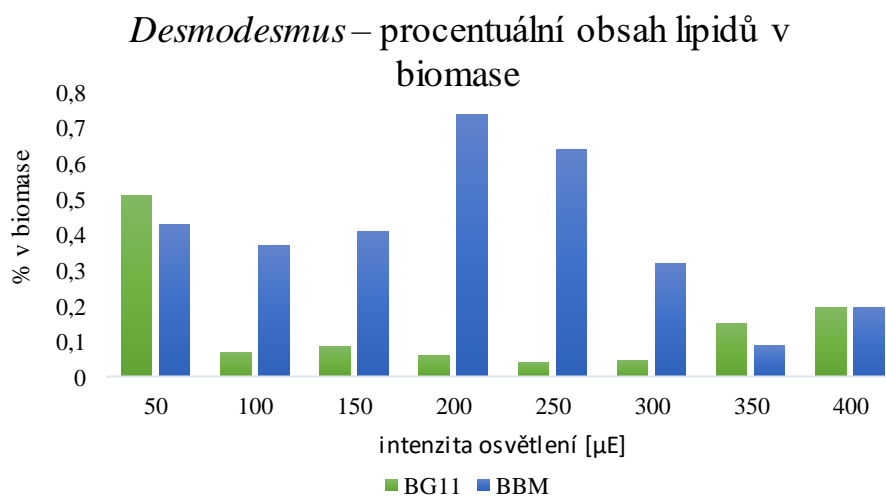
5.3.1.4 Produkce lipidů

Analýza lipidů probíhala na soustavě GC/FID a byl využit transesterifikovaný vzorek obsahující methylestery mastných kyselin. Souhrnné výsledky celkové produkce lipidů *Desmodesmus* při autotrofním způsobu kultivace jsou uvedeny v grafu (Obrázek 45). Největší koncentrace lipidů byla zaznamenána u kultivace na BBM médiu při 200 µE, kde byly lipidy zastoupeny o koncentraci 3,6 mg/l kultury. Celkově u kultivací na BBM médiu byla koncentrace lipidů značně vyšší, maximální hodnota 3,6 mg/l byla u osvětlení 200 µE.



Obrázek 45 Produkce celkových lipidů u autotrofních kultivací *Desmodesmus*

Akumulace lipidů v biomase *Desmodesmus acutus* je velmi nízká. Jejich procentuální zastoupení se blíží maximálně 1 %. V grafu (Obrázek 46) lze vidět, že mírně vyššího obsahu lipidů dosáhly řasy v BBM médiu.



Obrázek 46 Procentuální obsah lipidů v biomase u autotrofních kultivací *Desmodesmus*

Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích z autotrofních kultivací *Desmodesmus* je uvedeno v následujících tabulkách (Tabulka 7 a Tabulka 8). U kultivací na BBM médiu jsou majoritně zastoupeny u všech vzorků kyselina heptadekanová, linolenová a arachová. Zřídka se v některých vzorcích vyskytuje i kyselina linoleaidová, tridekanová, olejová a palmitoolejová. Zastoupení kyseliny arachové bylo proměnlivé, nejvyšší obsah byl naměřen při kultivacích s větší intenzitou osvětlení, nejvíce ji obsahoval vzorek z kultivace při osvětlení 350 µE.

Složení mastných kyselin u kultivací *Desmodesmus* na BG11 médiu se oproti předchozím lišilo, nejhojněji byla zastoupená kyselina linolenová v rozmezí 45 % až 87,6 %. U dvou posledních vzorků s nejvyšší intenzitou osvětlení se vyskytovala ve vysokých procentech i kyselina heptadekanová. Sporadický výskyt byl pozorován u kyseliny myristolejové, palmitolejové a elaidové.

Tabulka 7 Procentuální zastoupení mastných kyselin u autotrofních kultivací *Desmodesma* v BBM médiu

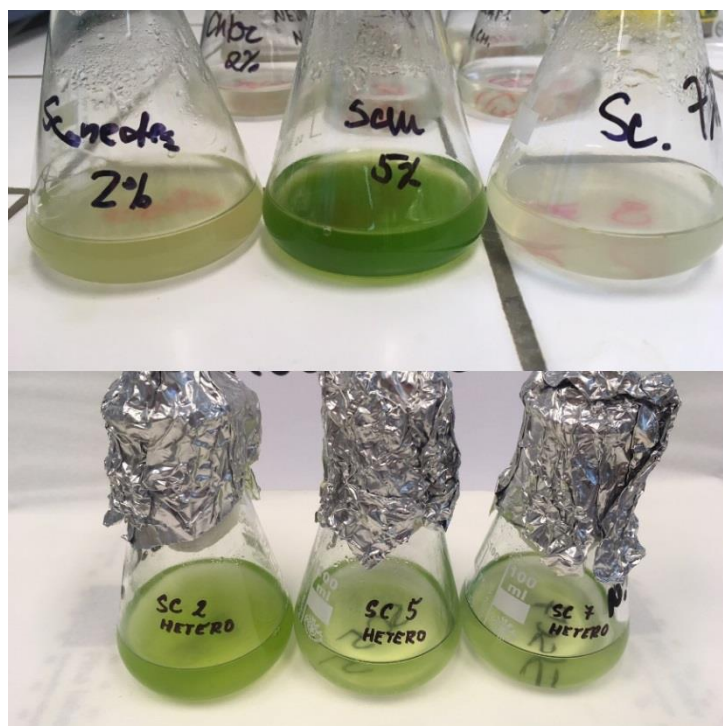
BBM médium								
kyselina [%]	50 μ E	100 μ E	150 μ E	200 μ E	250 μ E	300 μ E	350 μ E	400 μ E
kaprinová	0,7	1,7	0,0	0,7	0,0	0,7	1,9	0,0
pentadekanová	3,0	2,5	1,5	1,2	2,9	1,8	0,0	5,1
heptadekanová	30,1	46,7	25,4	27,4	49,3	31,2	4,8	60,9
stearová	0,5	0,6	0,7	1,0	0,9	0,8	6,9	1,7
linolelaidová	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
linolová	0,4	0,0	0,4	0,5	0,4	0,0	3,1	0,0
linolenová	53,3	40,1	50,5	56,5	0,0	58,7	0,0	0,9
arachová	11,2	7,7	20,9	11,3	45,6	6,9	82,6	30,3
tridekanová	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cis-11,14-eicosadienová	0,0	0,0	0,5	1,4	0,0	0,0	0,0	1,0
olejová	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,8	0,0
palmitolejová	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0

Tabulka 8 Procentuální zastoupení mastných kyselin u autotrofních kultivací *Desmodesma* v BG11 médiu

BG11 médium								
kyselina [%]	50 μ E	100 μ E	150 μ E	200 μ E	250 μ E	300 μ E	350 μ E	400 μ E
kaprinová	1,1	5,5	0,0	4,8	0,0	0,0	2,1	2,8
myristolejová	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
palmitová	0,2	1,6	0,0	2,7	2,4	1,6	0,0	0,3
palmitolejová	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
heptadekanová	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,3	24,3
elaidová	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
γ -linolenová	11,7	13,6	20,2	0,0	31,5	22,8	9,5	0,0
linolenová	76,7	79,3	79,8	87,6	61,4	75,6	52,1	45,0
arachidonová	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,6
stearová	0,0	0,0	0,0	5,0	4,8	0,0	0,0	0,0

5.3.2 Heterotrofní kultivace

Heterotrofně byl *Desmodesmus* kultivován na modifikovaných BG11 médiích s přidavkem glukózy a glycerolu vždy ve třech různých koncentracích organického zdroje uhlíku. Řasy kmene *Desmodesmus acutus* byly schopné růstu na těchto médiích. Výsledný vzhled kultur je uveden na fotografii (Obrázek 47), kde v horní části jsou kultivace na médiích s přidavkem 2%, 5% a 7% glukózy a v dolní části pak s přidavkem glycerolu ve stejném pořadí.

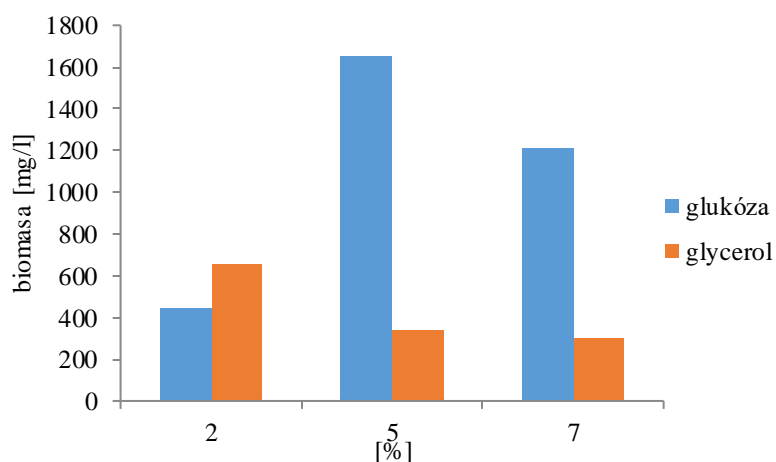


Obrázek 47 Výsledný vzhled heterotrofních kultivací řasy *Desmodesmus* (nahore glukózové medium, dole glycerolové médium)

5.3.2.1 Celková biomasa

Výsledky gravimetrického stanovení celkové biomasy u heterotrofních kultivací *Desmodesma* jsou uvedeny v grafu (Obrázek 48). Největší výnosy byly zaznamenány u kultivací na glukózových médiích, kdy byl nárůst kultury 1,65 g/l u 5% přidavku glukózy. Tato hodnota produkce biomasy převyšuje všechny dříve dosažené koncentrace u autotrofních kultivací.

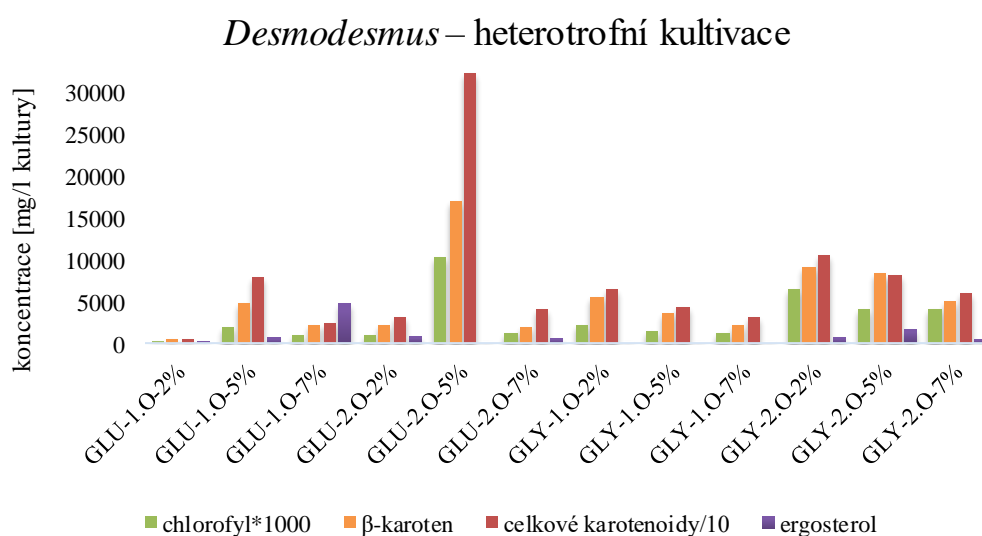
Heterotrofní kultivace – *Desmodesmus*



Obrázek 48 Celková biomasa u heterotrofních kultivací *Desmodesmus*

5.3.2.2 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

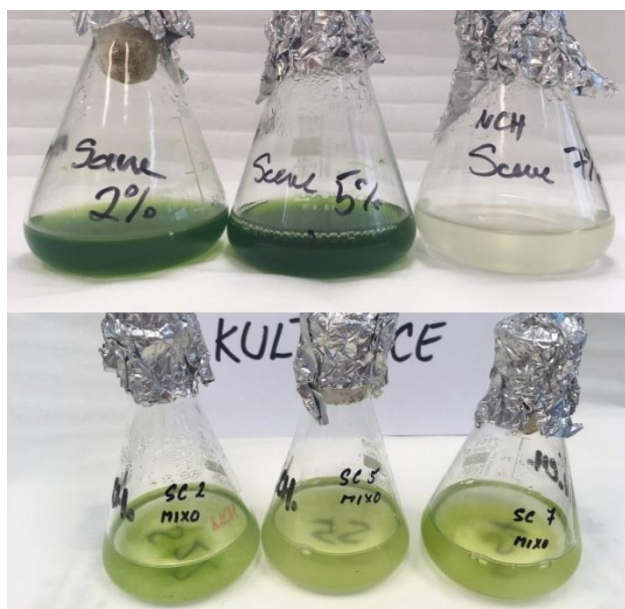
Produkční schopnosti karotenoidů, β -karotenu a chlorofylu stanovené pomocí HPLC/PDA u heterotrofních kultivací *Desmodesmus* jsou shrnuty v grafu (Obrázek 49). V čase mezi prvním a druhým odběrem (od 96. hodiny kultivace) došlo u všech vzorků ke zvýšení koncentrace sledovaných látek. Patrné je, že při této kultivaci prováděné za tmy klesla u všech vzorků po dobu celé kultivace tvorba chlorofylu a naopak se zvýšila produkce β -karotenu. Největší koncentrace těchto pigmentů i celkových karotenoidů byla změřena u vzorku kultivovaného na BG11 médiu s přídavkem 5% glukózy na konci kultivace. Ergosterol se objevoval jen zřídka. U kultivací na glukózových médiích se nacházel ve vyšší koncentraci jen při kultivaci na médiu s obsahem 7% glukózy. U glycerolových médií k jeho produkci docházelo až ve druhé polovině kultivace.



Obrázek 49 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u heterotrofních kultivací *Desmodesmus*

5.3.3 Mixotrofní kultivace

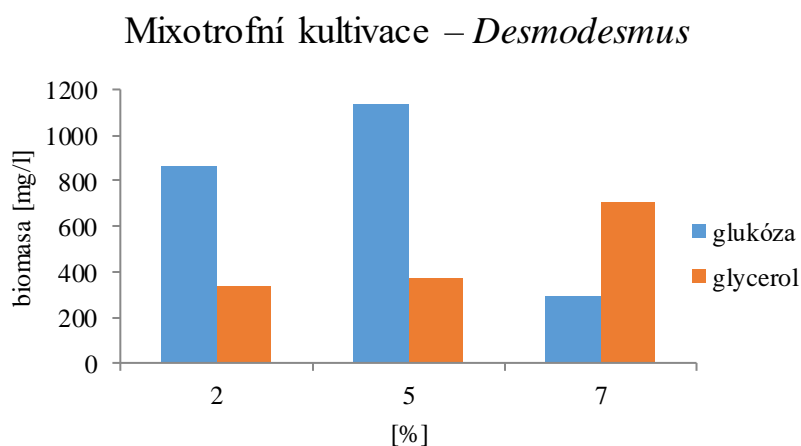
Mixotrofně byl *Desmodesmus* kultivován taktéž na BG11 médiu s přidavkem glukózy a glycerolu jako u heterotrofních kultivací. Řasa byla schopna růstu na všech takto modifikovaných médiích, zejména na glukózových. Na fotografii (Obrázek 50) je výsledný vzhled mixotrofních kultivací.



Obrázek 50 Výsledný vzhled mixotrofních kultivací řasy *Desmodesmus* (nahore glukózové médium, dole glycerolové médium)

5.3.3.1 Celková biomasa

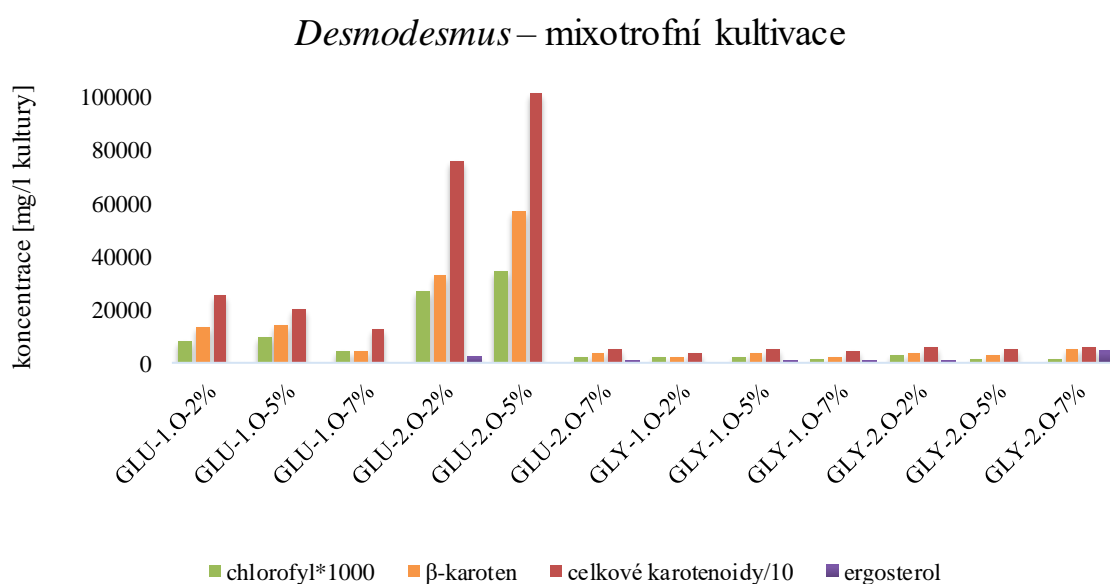
Biomasa byla u mixotrofních kultivací stanovena gravimetricky a výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafu (Obrázek 51). Největší produkce bylo dosaženo v médiích s přidavkem 5% a 2% glukózy, tyto hodnoty činily 0,8 a 1,1 g/l.



Obrázek 51 Celková biomasa u mixotrofních kultivací řasy *Desmodesmus*

5.3.3.2 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu

Produkce vybraných metabolitů jako je β -karoten, chlorofyl, ergosterol a celkové karotenoidy byla stanovena pomocí metody HPLC/PDA (viz kapitola 4.5.3) a výsledky jsou uvedeny v grafu (Obrázek 52). Produkční schopnost stanovovaných látek je u glukózových médií výrazně vyšší než u médií s glycerolem. U všech vzorků výrazně převažuje β -karoten nad chlorofylem. Vysoká produkce celkových karotenoidů je zejména na konci kultivací na glukóze, kdy se jejich koncentrace minimálně zdvojnásobila. K produkci ergosterolu docházelo jen výjimečně, a to i tak v nízkých koncentracích. Celková produkce pigmentů byla ale vyšší než u heterotrofních kultivací, například koncentrace chlorofylu na médiu s 5 % glukózy byla u heterotrofních kultivací 16,9 mg/l a u mixotrofních kultivací 56,8 mg/l.



Obrázek 52 Produkce karotenoidů, chlorofylu a ergosterolu u mixotrofních kultivací *Desmodesmus*

5.3.4 Zhodnocení kultivací *Desmodesmus acutus*

Z výsledků kultivací řasy rodu *Desmodesmus acutus* bylo zjištěno, že nejvhodnějším médiem pro produkci celkové biomasy je BG11 médium s přidavkem glukózy, zejména při heterotrofním způsobu kultivace. Co se týče výtěžků lipidů, tak tento rod není na jejich produkci vhodný. Biomasa neobsahovala více jak 1 % lipidů.

5.4 Velkoobjemová kultivace

Na závěr práce byly vyzkoušeny velkoobjemové kultivace všech tří kmenů řas na obou dvou základních médiích. Podmínky těchto kultivací jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 9).

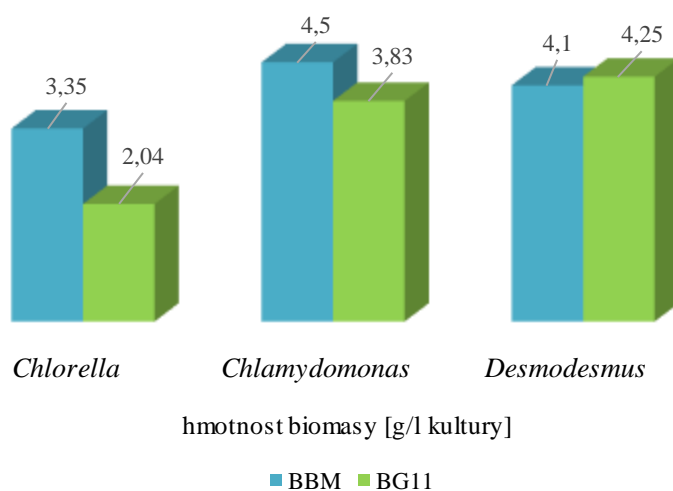
Tabulka 9 Podmínky velkoobjemových kultivací

Objem [l]	2
Teplota [°C]	20
Zdroj světla	zářivka
Průtok vzduchu [l/min]	3

U každé kultivace byla změřena doba kultivace a gravimetricky stanovena hmotnost biomasy. Bylo ověřeno, že větších výtěžků dosahuje *Chlorella* a *Chlamydomonas* v BBM médiu, *Desmodesmus* v médiu BG11. Kompletní výsledky jsou uvedeny níže v tabulce (Tabulka 10) a v grafu (Obrázek 53). Získaná biomasa z těchto kultivací byla lyofilizována a uskladněna v mrazicím zařízení na další experimenty.

Tabulka 10 Celková biomasa a doba kultivace řas u velkoobjemových kultivací

řasa	BBM médium		BG11 médium	
	c [g/l kultury]	doba kultivace [hod]	c [g/l kultury]	doba kultivace [hod]
<i>Chlorella v.</i>	3,35	148	2,04	196
<i>Chlamydomonas r.</i>	4,50	165	3,83	171
<i>Desmodesmus a.</i>	4,10	132	4,25	107



Obrázek 53 Hmotnost biomasy řas u velkoobjemových kultivací

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla koncipovaná jako komparativní studie na optimalizaci kultivačních podmínek, charakterizaci růstu a metabolickou aktivitu vybraných kmenů řas. Cílem byla kultivace řas na různých typech médií a při různých podmínkách, následná izolace a kvantifikace řasové biomasy a produkovaných metabolitů, jejichž využití je popsáno v teoretické části. K práci byly vybrány řasy kmene *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Desmodesmus acutus*.

V experimentální části byly u každého kmene vyzkoušeny autotrofní, heterotrofní a mixotrofní způsoby kultivace. Zde bylo zjištěno vhodné médium pro každý kmen řasy. Největší produkce biomasy dosahovala *Chlorella* při autotrofním způsobu kultivace na BBM médiu při osvětlení 200 μ E. Řasa *Chlamydomonas* nejvyšší produkce biomasy dosáhla při autotrofní kultivaci na BBM médiu a osvětlení 100 μ E. *Desmodesmus* nejvíce biomasy vyprodukoval u heterotrofní kultivace na BG11 médiu s přídavkem 5% glukózy, tato hodnota činila 1,65 g/l.

K největší produkci karotenoidů, β -karotenu a chlorofylu u řasy *Chlorella* docházelo při autotrofním způsobu kultivace na BBM médiu při nejnižším osvětlení 50 μ E. Ergosterol *Chlorella* nejvíce produkovala v BG11 médiu při osvětlení 250 μ E. K vyšší syntéze ergosterolu docházelo i u heterotrofních kultivací, kde jeho koncentrace byla vyšší než koncentrace β -karotenu. Největší koncentrace lipidů byla naměřena u kultivace na BBM médiu při 250 μ E a na BG11 médiu při intenzitě osvětlení 150 μ E. Řasa *Chlamydomonas* produkovala nejvíce karotenoidů a ergosterolu v BG11 médiu při osvětlení 400 μ E. Barviva chlorofyl a β -karoten byla zastoupena u kultivací *Chlamydomonas* nejvíce při osvětlení 50 μ E v BBM médiu. Největší koncentrace lipidů dosahovala u kultivace v BBM médiu při intenzitě osvětlení 350 μ E. *Desmodesmus* největší produkce karotenoidů, β -karotenu a ergosterolu dosahoval při kultivaci na BBM médiu a osvětlení 100 μ E. Chlorofyl byl touto řasou nejvíce syntetizován v BG11 médiu u nejnižšího osvětlení 50 μ E. Výtěžky lipidů tato řasa měla velmi nízké, avšak nejvyšší koncentrace byla naměřena u kultivace v BBM médiu s osvětlením 200 μ E.

Pro biotechnologickou produkci biomasy je nejvíce vhodný kmen *Desmodesmus acutus*. K produkci přírodních barviv chlorofylu, β -karotenu a karotenoidů jednoznačně vyhovuje *Chlamydomonas reinhardtii*. Ergosterol byla nejvíce schopná produkovat *Chlorella vulgaris*. Velkou výhodou řas je autotrofie a s ní spojené malé náklady na kultivační média. Stále značnou nevýhodou pro komerční využití těchto mikroorganismů zůstává pomalý růst a nízká produkce biomasy.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ALBERTS, Bruce. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902-9060-4.
- [2] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biotechnologie. 2. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. ISBN 80-708-0121-2.
- [3] Alga [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <http://www.alga.cz/c-22-laborator-rasove-biotechnologie.html>
- [4] Mikrobiologický ústav AV ČR [online]. [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://mbucas.cz/vyzkum/centrum-algatech/>
- [5] BARSANTI, L., GUALTIERI, P. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 301 s. ISBN 0-8493-1467-4
- [6] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [7] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5901-1.
- [8] Biomass and Bioenergy. 2013, 53. ISSN 09619534. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096195341200517X>
- [9] MATHIMANI, Thangavel, TamiKolundu SENTHIL KUMAR, Murugesan CHANDRASEKAR, Lakshmanan UMA a Dharmar PRABAHARAN. Assessment of fuel properties, engine performance and emission characteristics of outdoor grown marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 biodiesel. Renewable Energy. 2017, 105, 637-646. DOI: 10.1016/j.renene.2016.12.090. ISSN 09601481. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148116311594>
- [10] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [11] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biotechnologie. 2. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. ISBN 80-708-0121-2.
- [12] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [13] BOROWITZKA, Michael. The physiology of microalgae. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. ISBN 978-331-9249-438.
- [14] GUALTIERI, Paolo a Laura BARSANTI. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology [online]. Boca Raton: Taylor, 2006, 301 p. [cit. 2017-03-07]. ISBN 08-493-1467-4.
- [15] MUNIR, N., A. IMTIAZ, N. SHARIF a S. NAZ. Optimization of growth conditions of different algal strains and determination of their lipid contents. Journal of Animal and Plant Sciences [online]. Pakistan Agricultural Scientists Forum, 2015, 25(2), 546-553 [cit. 2017-02-01]. ISSN 10187081.
- [16] LUTHRIA, D. L. Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies. DOI: 1893997782.

- [17] SAMORÌ, Chiara, Diego LÓPEZ BARREIRO, Robin VET, Laura PEZZOLESI, Derk W. F. BRILMAN, Paola GALLETTI a Emilio TAGLIAVINI. Effective lipid extraction from algae cultures using switchable solvents. *Green Chemistry*. 2013, 15(2), 353-. DOI: 10.1039/c2gc36730k. ISSN 1463-9262. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2gc36730k>
- [18] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [19] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [20] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [21] *Biotechnology Advances*. 2007, 25(2). ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497500600139X>
- [22] LARRONDE-LARRETICHE, Mathieu a Xue JIN. Microalgal biomass dewatering using forward osmosis membrane: Influence of microalgae species and carbohydrates composition. *Algal Research*. 2017, 23, 12-19. DOI: 10.1016/j.algal.2016.12.020. ISSN 22119264. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926416308207>
- [23] SLADE, Raphael a Ausilio BAUEN. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*. 2013, 53, 29-38. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.12.019. ISSN 09619534. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096195341200517X>
- [24] BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 2007, 25(2), 207-210. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497500600139X>
- [25] GRAHAM, L. E., L. W.. WILCOX a L. J. STAL. *Algae: an economic perspective*. Second edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, c2000.
- [26] TECHNOLOGY. Algatech [online]. Israel: Algatechnologies Ltd., 2015 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.algatech.com/technology.asp>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PUFA – Polynenasycené mastné kyseliny

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PDA – Detektor diodového pole

GC – Plynová chromatografie

FID – Plamenově ionizační detektor

OD – Optická hustota

BG11 – Blue Green Medium

BBM – Bold's Basal Medium

CoA – Koenzym A

GLU – Glukózové médium

GLY – Glycerolové médium